

6 Ergebnisse und Diskussion

In dem Ergebnisteil ist der Einfluss von oxidierenden Substanzen (vornehmlich Peroxynitrit) auf Rinderserumalbumin, einem wasserlöslichen Protein, und Bacteriorhodopsin (BR) dargestellt. Da es sich bei BR um ein integrales Membranprotein handelt, das fast vollständig in der Lipiddoppelschicht lokalisiert ist, spielt die Untersuchung des Einflusses von oxidierenden Substanzen auf die Lipidphase ebenfalls eine wichtige Rolle.

6.1 Versuche mit 3-Morpholinosydnonimin

Um den Einfluss von Peroxynitrit auf Proteine zu untersuchen, wurde 3-Morpholinosydnonimin (SIN-1) eingesetzt. SIN-1 ist bei niedrigen pH-Werten (\leq pH 5,0) stabil, reduziert bei physiologischem pH-Wert jedoch gelösten Sauerstoff zum Superoxidradikalanion und setzt in einem zweiten Reaktionsschritt Stickstoffmonoxid frei (siehe Abschnitt 5.3.6.1). Da diese niedermolekularen Substanzen mit einer Geschwindigkeitskonstante von $1,9 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (20-22 °C) (Kissner et al., 1997) zu ONOO^- reagieren und außerdem in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander entstehen, stellt SIN-1 einen potentiellen, kontinuierlichen ONOO^- -Generator dar.

Zuerst wurde die Fähigkeit von SIN-1, ONOO^- zu bilden, an Phenol getestet. In Abbildung 6.1 sind die UV-VIS-Spektren von 2- bzw. 4-Nitrophenol und Phenol dargestellt.

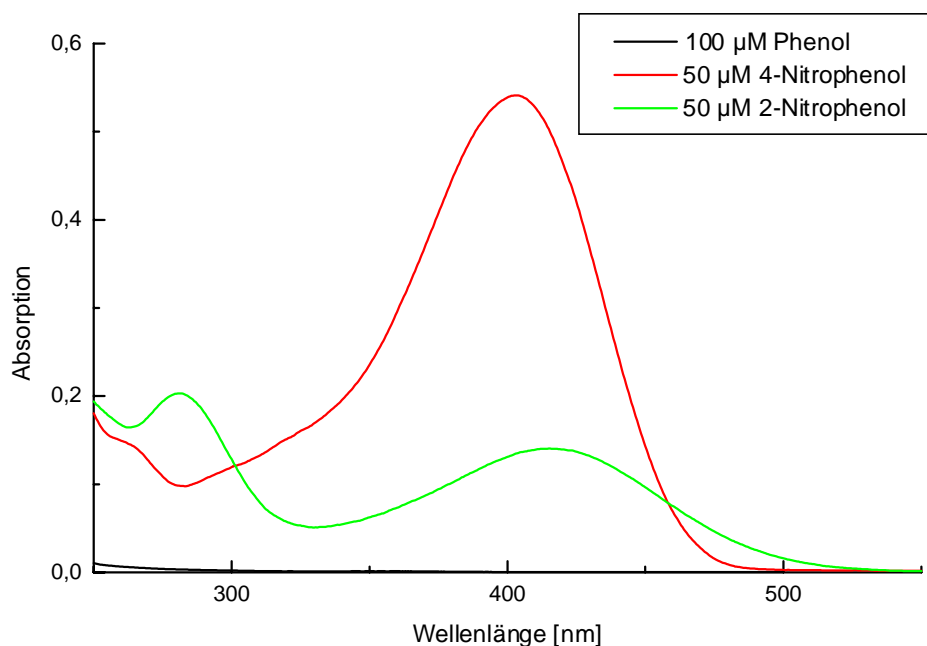


Abbildung 6.1: UV-VIS-Spektren von 50 µM 2-Nitrophenol bzw. 4-Nitrophenol in 50 mM Phosphatpuffer (pH 7,5) und 100 µM Phenol in 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,4).

2-Nitrophenol bzw. 4-Nitrophenol absorbieren Licht auch bei Wellenlängen > 400 nm (λ_{\max} (2-Nitrophenol) = 416 nm; λ_{\max} (4-Nitrophenol) = 403 nm), während Phenol ($\lambda_{\max} = 220$ nm), SIN-1 ($\lambda_{\max} = 280$ nm) und dessen Zerfallsendprodukt ($\lambda_{\max} = 292$ nm) in diesem Bereich keine Absorption zeigen. Im folgenden wurden daher zeitabhängig die Absorptionsänderungen bei 410 nm aufgezeichnet, nachdem Phenol und SIN-1 bei pH 7,5 miteinander vermischt wurden. Unabhängig davon, welches der beiden Nitrophenole sich bildet, ist eine Absorptionszunahme bei 410 nm ein Hinweis für die Bildung von ONOO^- . Eine Auswertung der Kinetiken ist nicht möglich, da der Anteil des jeweils gebildeten Nitrophenols nicht ermittelt wurde. In Abbildung 6.2 sind die Absorptionsänderungen bei 410 nm dargestellt, wenn Phenol und SIN-1 unter verschiedenen Bedingungen miteinander versetzt werden.

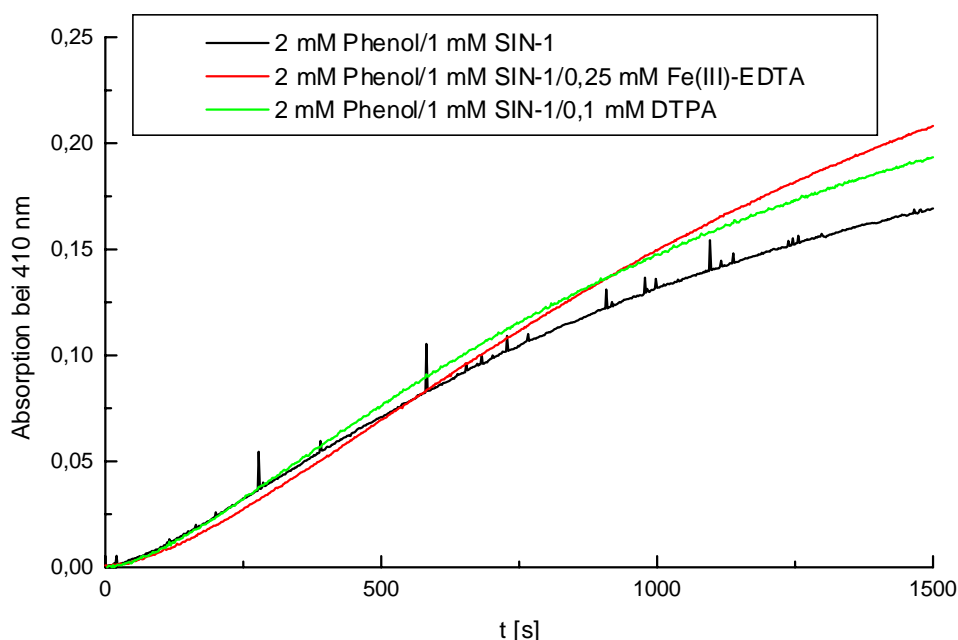


Abbildung 6.2: Zeitabhängige Zunahme der Absorption bei 410 nm des Reaktionsgemischs Phenol/SIN-1 unter Ab- und Anwesenheit von Fe(III)-EDTA bzw. DTPA; 2 mM Phenol wurden mit 1 mM wässriger SIN-1-Lösung vermischt. In weiteren Reaktionsansätzen wurde zusätzlich eine Konzentration von 0,25 mM Fe(III)-EDTA bzw. 0,1 mM DTPA eingestellt. Die Reaktionen wurden jeweils in 50 mM Phosphatpuffer (pH 7,5) bei 20 °C durchgeführt.

Es finden bei 410 nm Absorptionszunahmen statt. Das UV-VIS-Spektrum dieser Reaktionsansätze zeigt, dass hier das Absorptionsmaximum der Reaktionslösung vorliegt. Die Bildung von Nitrophenol und vorhergehend ONOO^- ist daher naheliegend. Durch den Einsatz von Dihydrorhodamin 123 anstelle von Phenol konnte die Bildung von ONOO^- aus SIN-1 unter den angegebenen Bedingungen untermauert werden (Rexroth, 1999). Die Zunahme der Nitrierungsreaktionen durch Peroxynitrit in Anwesenheit von Fe(III)-EDTA (Radi et al.,

1999) konnte an diesem System ebenfalls verifiziert werden. Die Abnahme von Nitrierungsreaktionen durch Zugabe von DTPA konnte dagegen nicht bestätigt werden. Verglichen mit dem Versuchsverlauf in Anwesenheit von Fe(III)-EDTA zeigt sich zwar tatsächlich eine geringe Inhibierung, aber verglichen mit dem Ansatz, in dem lediglich Phenol und SIN-1 vorhanden sind, eine Stimulierung von Nitrierungsreaktionen durch DTPA. Wenn anstelle von Phenol Purpurchromophor (PM) oder Rinderserumalbumin (BSA) als Reaktionspartner eingesetzt werden (PM ~ 0,2 mg BR/ml, BSA ~ 1 mg/ml), zeigte sich bei 430 nm (Absorptionsmaximum von deprotoniertem 3-Nitrotyrosin) keine Absorptionsänderung. Somit hat sich - wenn überhaupt - nur sehr wenig 3-Nitrotyrosin (NT) gebildet. Als naheliegende Ursache hierfür kann man im Fall von PM vermuten, dass die gebildete ONOO⁻-Menge zu gering war (siehe Abbildung 6.13, Seite 130), da sogar 5 mM ONOO⁻ im UV-VIS-Spektrum von PM nur geringe Änderungen induzieren. Eine weitere Erklärung für das Ausbleiben der Bildung von NT ist die Reduktion von funktionellen Gruppen des Proteins anstelle von Sauerstoff, z.B. Reduktion von Cystin zu Cystein bei BSA (17 Cystine, 1 Cystein). Wenn jedoch die Reduktion von Sauerstoff zu Superoxid unterbleibt, kann keine Bildung von ONOO⁻ stattfinden. In der Literatur findet sich allerdings kein Hinweis für die Relevanz eines solchen Prozesses. Sehr viel wahrscheinlicher ist es, dass ONOO⁻ primär mit der freien Sulfhydrylgruppe an Cys 34 reagiert, da die Geschwindigkeitskonstante für diese Reaktion $3900 \pm 500 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ beträgt (Alvarez *et al.*, 1999). Schließlich liegt NT bei pH 7,5 nur zu ca. 50 % in der bei 430 nm absorbierenden, deprotonierten Form vor, so dass für die Detektion kleiner Mengen NT keine optimalen Bedingungen herrschen.

Da SIN-1 in Gegenwart von Proteinen scheinbar nur geringe Mengen NT (über Bildung von Peroxynitrit) generiert, wurden keine weiteren Untersuchungen diesbezüglich angestellt. Vielmehr wurde im folgenden direkt ONOO⁻ eingesetzt, das zuvor in einer Stopped-flow-Apparatur synthetisiert wurde (siehe Abschnitt 5.3.4).

Die momentan geführte Diskussion über die Nitrierungseffizienz von O₂^{•-}/NO[•]-produzierenden Systemen verglichen mit der von zuvor synthetisiertem ONOO⁻ war zum Zeitpunkt der Messungen noch nicht aktuell. Nach Reiter *et al.* (2000) ist die Nitrierungseffizienz beider Systemen äquivalent, während Pfeiffer *et al.* (2000) bei O₂^{•-}/NO[•]-produzierenden Systemen mit steady-state Konzentrationen der Radikale (< 120 µM/min) eine sehr viel geringere Nitrierungseffizienz feststellen als für synthetisiertes ONOO⁻. 1 mM SIN-1 generieren bei Raumtemperatur und pH 7,4 ~ 6 µM/min NO[•] und ~ 5 µM/min O₂^{•-} (Pfeiffer *et al.*, 1998).

6.2 Reaktionen von Peroxynitrit mit *cis*-Parinarsäure in der Lipidphase

6.2.1 Ermittlung geeigneter Versuchsparameter

Wie in Abschnitt 5.3.5 beschrieben, wurde mit Hilfe von *cis*-Parinarsäure die Reaktivität von Peroxynitrit in der Lipidphase überprüft. Hierzu wurden einer Liposomensuspension aus EPC und EPA geringe Mengen an *cis*-Parinarsäure zugefügt. Ob sich der Fluorophor in die Lipidphase einlagert, kann man mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie überprüfen, da *cis*-Parinarsäure in wässriger Umgebung nur schwach fluoresziert. Die Versuche wurden bei 25 °C und somit deutlich oberhalb der Schmelztemperatur der eingesetzten Lipidmischung durchgeführt. Um den Bereich der Linearität zwischen Fluoreszenzintensität und Fluorophorkonzentration zu ermitteln, wurden zuerst Fluoreszenzmessungen unter Variation der Lipidkonzentration durchgeführt (Kuypers *et al.*, 1987).

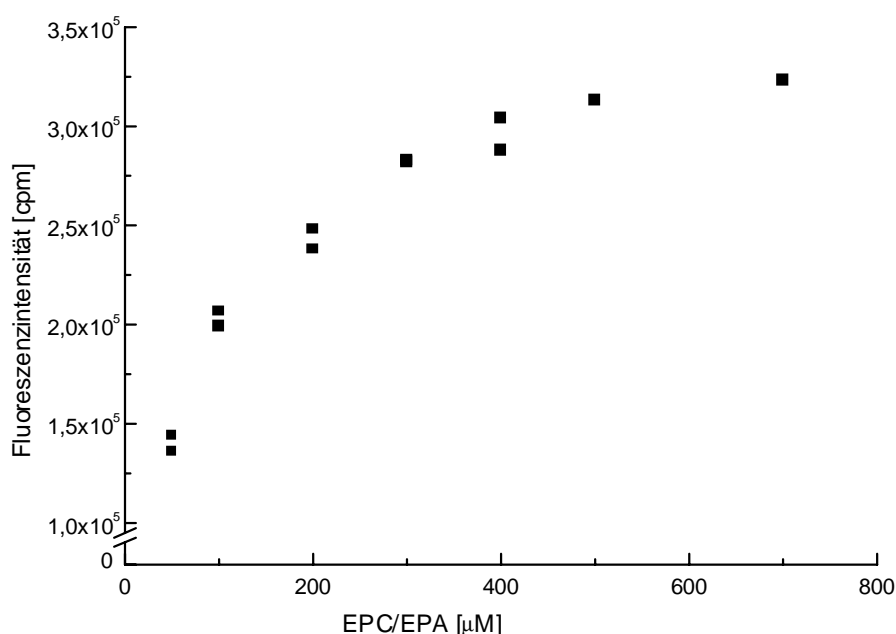


Abbildung 6.3: Auftragung der Fluoreszenzintensität (cpm = counts per minute) von *cis*-Parinarsäure ($\lambda_E = 324$ nm, $\lambda_{Em} = 413$ nm) als Funktion der Lipidkonzentration (EPC/EPA = 9/1 (w/w)) bei konstanter Fluorophorkonzentration; die mit der „Reverse-Phase“-Methode (siehe Abschnitt 5.3.1) erhaltenen EPC/EPA-Liposomen hatten einen maximalen Durchmesser von ca. 0,2 μm . Die Messungen wurden in 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) bei 25 °C durchgeführt. Die Konzentration von *cis*-Parinarsäure betrug immer 6,8 μM .

Die Auftragung der gemessenen Fluoreszenzintensität gegen die Lipidkonzentration (siehe Abbildung 6.3) nähert sich bei Konzentrationen größer 400 μM einem Grenzwert. Bei Konzentrationen kleiner 400 μM ist das Verhältnis Fluorophor zu Lipid noch so groß, dass hier trotz konstanter Menge an *cis*-Parinarsäure eine Erhöhung der Lipidkonzentration in einem Anstieg der Fluoreszenzintensität resultiert. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass

bei zu geringen Lipidkonzentrationen *cis*-Parinar-säure sich nicht vollständig in die Lipidphase einbaut. Da mit zunehmender Lipidkonzentration (Lipide liegen als Liposomen mit einem maximalen Durchmesser von ca. 0,2 μm vor) auch die Lichtstreuung des Anregungslichts und somit auch die Zahl detektierter Photonen am Detektor steigt, ist eine zu hohe Lipidkonzentration zu vermeiden. Die Zunahme der Lichtstreuung könnte eine Erklärung für das weitere allerdings schwächere Ansteigen der Ordinatenwerte oberhalb 400 μM EPC/EPA sein. Daher wurde in allen weiteren Versuchen die Lipidkonzentration immer auf 400 μM eingestellt. Um die Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Fluorophorkonzentration zu untersuchen, wurden Versuche bei konstanter Lipidkonzentration und variierender *cis*-Parinar-säurekonzentration durchgeführt.

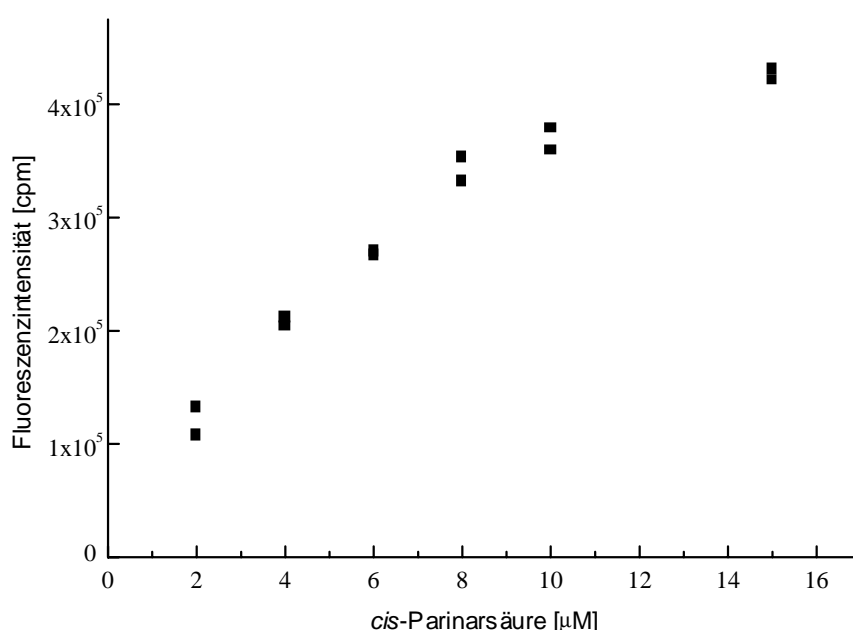


Abbildung 6.4: Auftragung der Fluoreszenzintensität (cpm = counts per minute) von *cis*-Parinar-säure ($\lambda_{\text{Ex}} = 324 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 413 \text{ nm}$) als Funktion der Konzentration von *cis*-Parinar-säure; die Messungen wurden in 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) bei 25 °C durchgeführt. Die Konzentration des Lipidgemisches (EPC/EPA = 9/1 (w/w)) betrug in allen Proben immer 400 μM .

Wie in Abbildung 6.4 erkennbar, zeigen die Messwerte ein ähnliches Verhalten wie in Abbildung 6.3. Bei kleinen Konzentrationen ($< 8 \mu\text{M}$) ergibt sich ein ungefähr linearer Zusammenhang, was als Hinweis darauf gedeutet werden kann, dass in diesem Konzentrationsbereich ein vollständiger Einbau des Fluorophors in die Lipidphase stattfindet. Effekte, wie die Reabsorption, welche die Fluoreszenzintensität mindern können, sind in diesem Bereich ohne Bedeutung. Bei Erhöhung der Fluorophorkonzentration verlässt man diesen linearen Bereich und nähert sich einem Sättigungswert. Dies ließe sich beispielsweise durch unvollständigen Einbau des Fluorophors in die Lipidphase erklären (im wässrigen Milieu

fluoresziert *cis*-Parinarsäure nur im geringen Maße!), wenn das Fluorophor-Lipidverhältnis zu groß wird. Die Bildung von nicht-fluoreszierenden Excimeren (Dimer von 2 Molekülen *cis*-Parinarsäure, das nur im angeregten Zustand existiert) bei zu hoher Fluorophorkonzentration in der Lipidphase oder Reabsorptionsprozesse wären weitere Erklärungsmöglichkeiten. Diese Deutungen gehen konform mit den Messwerten aus Abbildung 6.3.

Die anschließenden Versuche mit Peroxynitrit wurden bei einer Lipidkonzentration von 400 μM und einer Fluorophorkonzentration von 6,8 μM in 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) durchgeführt. Bei diesen Konzentrationen und dem sich ergebenden Lipid-Fluorophor-Verhältnis (Lipid/*cis*-Parinarsäure ~ 60) ist ein Rückgang der Fluoreszenzintensität durch ONOO^- -Zugabe höchstwahrscheinlich auf die Verminderung der Konzentration der fluoreszierenden Spezies (durch Reaktion mit Peroxynitrit in andere Produkte) zurückzuführen.

6.2.2 Einfluss von Peroxynitrit auf die Fluoreszenzintensität von *cis*-Parinarsäure

Mit den in Abschnitt 6.2 ermittelten Versuchsparametern wurde der Einfluss variierender Peroxynitrit-Konzentrationen auf die Fluoreszenzintensität von *cis*-Parinarsäure in Liposomenmembranen untersucht. Mit diesen Versuchen sollte überprüft werden, ob Peroxynitrit mit Substanzen reagieren kann, wenn diese in die Lipiddoppelschicht von Liposomen eingebettet sind. Abbildung 6.5 zeigt, dass die Fluoreszenz von *cis*-Parinarsäure durch Zugabe von ONOO^- abnimmt. Eine 0,7 mM Anfangskonzentration von ONOO^- im Reaktionsansatz (ONOO^- /*cis*-Parinarsäure ~ 100) lässt die Fluoreszenzintensität stark absinken. Die hierfür in der Abbildung angegebene Abnahme von ca. 85 % gilt unter der Voraussetzung, dass bei vollständiger Zerstörung der *cis*-Parinarsäure eine Fluoreszenzintensität von null gemessen würde. Aufgrund des Dunkelstroms im Photomultiplier und der Streuung des Anregungslichts an den Liposomen ist der Messwert bei Abwesenheit von *cis*-Parinarsäure jedoch sicherlich größer null. Im Extremfall wird bei einer Konzentration von 0,7 mM ONOO^- bereits der gesamte Fluorophor zerstört, und der vom Photomultiplier angezeigte Wert ist auf die oben genannten Effekte zurückzuführen. Dies sind jedoch Hypothesen, da Messungen des Photomultipliersignals bei alleiniger Anwesenheit von Liposomen (ohne *cis*-Parinarsäure) nicht durchgeführt wurden. Bei Betrachtung der Messwerte in der halblogarithmischen Auftragung in Abbildung 6.5 fällt auf, dass bei abnehmenden ONOO^- -Konzentrationen die Fluoreszenzintensitäten kaum noch weiter abnehmen. Der Einsatz von 7 μM ONOO^- (ONOO^- / *cis*-Parinarsäure $\sim 1 / 1$) reduziert die Fluoreszenzintensität um ca. 15 %. Eine vollständige Fluoreszenzlöschung, die theoretisch bei diesem Verhältnis der Konzentrationen möglich wäre, wird bei weitem nicht erreicht. Dieser Befund lässt sich damit erklären, dass

neben der Reaktion von Peroxynitrit mit *cis*-Parinarsäure auch Konkurrenzreaktionen möglich sind, wie die Isomerisierung zu Nitrat oder Reaktionen mit Lipidmolekülen (siehe Abschnitt 3.1.1.2). Bei ONOO^- -Konzentrationen $< 5 \mu\text{M}$ scheint die Abnahme der Fluoreszenzintensität unabhängig von dieser Konzentration zu sein. Als mögliche Ursachen für die hier gemessenen geringen Abnahmen wären Messfehler zu nennen. Weiterhin wurde in Abschnitt 5.3.5 auf die Empfindlichkeit der *cis*-Parinarsäure gegenüber Photoausbleichung hingewiesen, welche die Handhabung dieser Substanz erschweren. Eine signifikante Zerstörung der fluoreszierenden Spezies durch Peroxynitrit in diesem Bereich ist eher unwahrscheinlich.

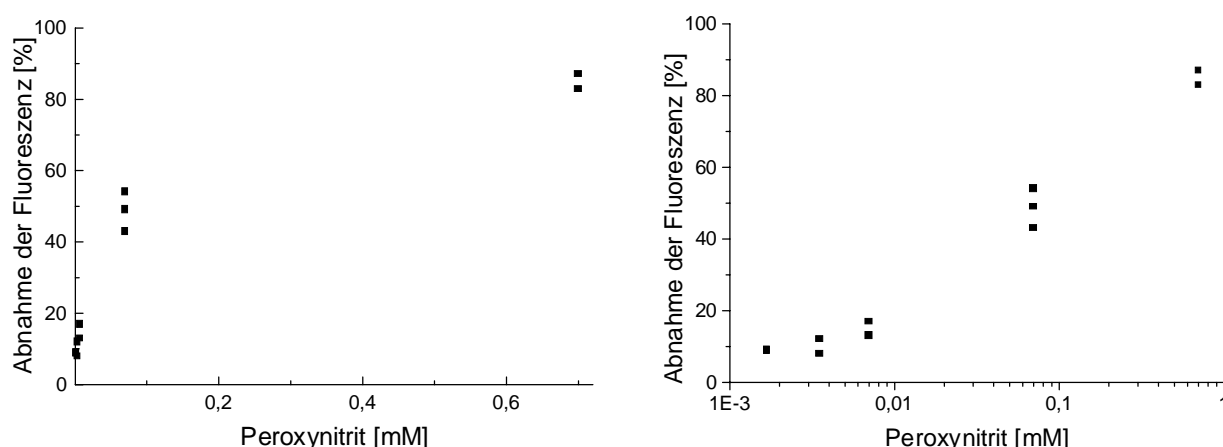


Abbildung 6.5: Abnahme der Fluoreszenzintensität ($\lambda_{\text{Ex}} = 324 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 413 \text{ nm}$) von in Liposomen (EPC/EPA = 9/1 (w/w); $400 \mu\text{M}$) eingelagerter *cis*-Parinarsäure ($6,8 \mu\text{M}$) durch Zugabe von Peroxynitrit. Die Reaktion fand in 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) statt. Die Fluoreszenzintensität wurde 100 s nach ONOO^- -Zugabe gemessen. Die Temperatur während der Reaktion und der Fluoreszenzmessung betrug jeweils $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Rechts ist die zugehörige halblogarithmische Auftragung dargestellt.

Versuche mit Nitrit (NO_2^-), Nitrat (NO_3^-) oder Wasserstoffperoxid (H_2O_2), die als nicht umgewandelte Edukte bzw. entstandene Produkte in der ONOO^- -Stammlösung vorhanden sind (siehe Abschnitt 5.3.6), zeigten in diesem Zeitrahmen nur einen geringen Einfluss auf die Fluoreszenzintensität. Phänomene, wie dynamische oder statische Fluoreszenzlöschung, Reabsorption oder Zerstörung der fluoreszierenden Spezies durch diese Moleküle, wurden somit als Ursache für die Abnahme der Fluoreszenzintensität ausgeschlossen.

Auch wenn eine Betrachtung der angegebenen, absoluten Prozentzahlen nur mit aller Vorsicht durchzuführen ist, lassen die Messwerte eindeutig erkennen, dass Peroxynitrit in der Lipidphase Reaktionen durchführen kann. Verglichen mit Abschnitt 6.5 und 6.8 führen hier bereits geringe ONOO^- -Konzentrationen zu einer Abnahme der Fluoreszenzintensität von

cis-Parinarsäure. Die Ermittlung der genauen Konzentration, bei der signifikante Mengen der fluoreszierenden Spezies durch Peroxynitrit zerstört werden, ist aufgrund der Oxidationsempfindlichkeit von *cis*-Parinarsäure nur bedingt möglich, und war auch nicht Ziel dieses Versuches. Da NO_2^- , NO_3^- und H_2O_2 nur einen geringen Einfluss auf die Fluoreszenzintensität zeigen, kommt als Ursache für die Abnahme der Fluoreszenzintensität einzig die Reaktion von Peroxynitrit mit *cis*-Parinarsäure in Frage. Die konkurrierende Isomerisierung zu Nitrat bzw. die Reaktion mit ungesättigten Lipiden könnte erklären, warum beispielsweise $70 \mu\text{M ONOO}^-$ ($\text{ONOO}^- / \textit{cis}$ -Parinarsäure $\sim 10 / 1$) nicht zu einer vollständigen Abnahme der Fluoreszenz führen.

6.3 Messung der steady-state Fluoreszenzanisotropie von DPH an Liposomen

Wie bereits in Abschnitt 3.1.1.5 erwähnt, wird der Einfluss von oxidierenden Spezies auf die physikalischen und chemischen Eigenschaften von Lipiddoppelschichten als potentielle Ursache des Alternsprozesses diskutiert. Der Zunahme der Membranviskosität durch oxidative Veränderungen an den Membrankomponenten kommt hierbei eine Schlüsselrolle zu (Yu, 1995). Da die Biomembranen, welche die Zellen bzw. Zellkompartimente umgeben, sehr komplex sind, was die Interpretation der erhaltenen Daten erschwert, wurden Versuche mit Liposomen durchgeführt, in die Diphenylhexatrien (DPH) als Fluorophor (siehe Abschnitt 5.4.12) eingebaut wurde. Die Liposomen wurden einerseits aus DMPC, einem Lecithin mit zwei gesättigten Fettsäureketten (14:0) bzw. DLPC hergestellt, dessen beide Fettsäureketten jeweils zweifach ungesättigt (18:2) sind und somit der Lipidperoxidation (siehe Abschnitt 3.1.1.3) unterliegen können. An den DMPC-Liposomen wurde die Messung der steady-state Fluoreszenzanisotropie (im folgenden Fluoreszenzanisotropie abgekürzt) als Parameter für die Membranviskosität getestet. DMPC hat eine Phasenübergangstemperatur von ca. $23,5^\circ\text{C}$, d.h. allein durch Variation der Temperatur sollte an diesem System eine plötzliche Veränderung in der Fluoreszenzanisotropie detektiert werden.

An den DLPC-Liposomen wurden Messungen der Fluoreszenzanisotropie bei konstanter Temperatur durchgeführt. Die einzelnen Proben wurden zuvor unterschiedlich lange vor und nach Initiation von Lipidperoxidation durch Peroxynitrit bei 37°C inkubiert.

Die Liposomen wurden, wie in Abschnitt 5.3.1 beschrieben, hergestellt. Im Fall von DMPC erfolgte direkt anschließend der Einbau von DPH (siehe Abschnitt 5.4.12). Vor den Messungen an den Liposomen wurde täglich jeweils die Messung von DPH in Glycerin bei ca. 4°C als Kontrolle durchgeführt. Es resultierten hieraus stets Werte zwischen $\bar{r} = 0,34\text{--}0,35$,

da DPH unter diesen Bedingungen fast immobilisiert ist. Der Maximalwert der Fluoreszenzanisotropie (bei vollständiger Immobilisierung) beträgt $\bar{r} = 0,4$.

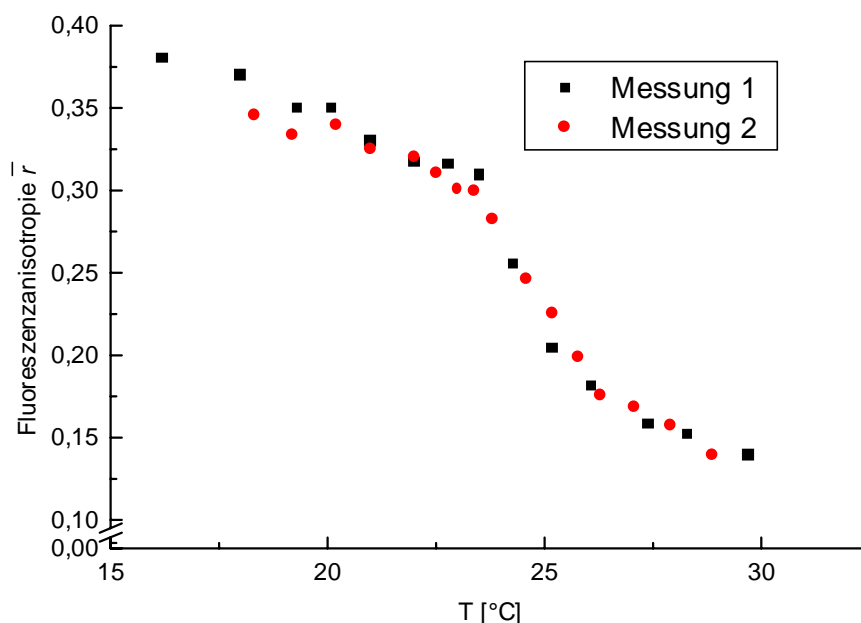


Abbildung 6.6: Messung der steady-state Fluoreszenzanisotropie \bar{r} an DMPC-Liposomen mit eingebautem DPH in Abhängigkeit von der Temperatur; in die mit der „Reverse-Phase“-Methode (siehe Abschnitt 5.3.1) erhaltenen DMPC-Liposomen ($0,1 \text{ mg/ml} \hat{=} 0,15 \text{ mM}$)¹ in 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) wurde DPH ($0,5 \text{ } \mu\text{M}$)¹ eingebaut (siehe Abschnitt 5.4.12). Das Lipid/DPH-Verhältnis betrug bei vollständigem Einbau 300:1 (n/n). Die Anregungs- bzw. Emissionswellenlänge betrug $\lambda_{\text{Ex}} = 382 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{Em}} = 435 \text{ nm}$. Die Temperatur wurde mittels eines Pt-100-Messfühlers direkt in der Küvette gemessen. Es wurden zwei verschiedene Ansätze vermessen.

Vor allen Messungen (Glycerin und Liposomenproben) wurde der G-Faktor bestimmt. Dabei wurden die Spannungen an den beiden Photomultipliern so reguliert, dass der G-Faktor ungefähr eins betrug.

Die Ergebnisse der Messung von \bar{r} an den DMPC-Liposomen sind in Abbildung 6.6 dargestellt. Deutlich kann man die plötzliche Veränderung der Werte von \bar{r} erkennen, die den Übergang der Gelphase in die fluide Phase anzeigen. Die ermittelte Phasenübergangstemperatur beträgt ca. $24 \text{ } ^\circ\text{C}$, was in guter Übereinstimmung mit dem Literaturwert von $23,5 \text{ } ^\circ\text{C}$ (Dencher, 1990) steht. Der Wert für \bar{r} von 0,38 bei $16 \text{ } ^\circ\text{C}$ zeigt, dass DPH unter diesen Bedingungen in der DMPC-Lipiddoppelschicht fast komplett immobilisiert ist.

DLPC-Liposomen mit einer Konzentration von $0,17 \text{ mg/ml}$ in 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) wurden nach der „Reverse-Phase“-Methode hergestellt. $950 \text{ } \mu\text{l}$ DLPC-Liposomen

¹ Endkonzentration

wurden mit 50 μl 0,2 M NaOH-Lösung bei 37 °C vermischt, 2 min bei 37 °C inkubiert, dann auf eine Sephadex® G 25-Säule gegeben und mit 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) eluiert. Diese Probe diene als Referenz („Ref“). Die Zugabe von NaOH in die Referenz liegt darin begründet, dass die ONOO⁻-Stammlösung (siehe Abschnitt 5.3.4) basisch ist. Der eventuelle Einfluss basischer Lösungen auf \bar{r} wurde somit berücksichtigt.

Die Inkubation der DLPC-Liposomen ($\sim 0,1 \text{ mg/ml} \hat{=} 0,13 \text{ mM}$)¹ mit DPH ($0,5 \mu\text{M}$)¹ wurde von 50 min, wie im Fall der DMPC-Liposomen, auf 20 min verkürzt. Zu dieser Zeit ist bereits ausreichend DPH in die Lipiddoppelschicht eingebaut, und die potentielle Gefahr der Zerstörung des Fluorophors durch die oxidierenden Spezies in der Lipidphase wird herabgesetzt.

In einem Reaktionsansatz wurden DLPC-Liposomen ($0,16 \text{ mg/ml}$) mit ONOO⁻ (5 mM) bei 37 °C vermischt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden 1 ml der Probe aus dem Reaktionsgefäß auf eine Sephadex® G 25-Säule aufgetragen und mit 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) eluiert. Nach 20 min Inkubation der Liposomen ($\sim 0,1 \text{ mg/ml} \hat{=} 0,13 \text{ mM}$)¹ mit DPH ($0,5 \mu\text{M}$)¹ bei 37 °C wurde bei 27,6 °C (Wert willkürlich gewählt) \bar{r} gemessen. Das Lipid/DPH-Verhältnis betrug unter Annahme des kompletten Einbaus von DPH in die Lipiddoppelschicht $\sim 260:1$ (n/n). Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 6.1 aufgeführt.

Tabelle 6.1: Messung der steady-state Fluoreszenzanisotropie \bar{r} von DLPC-Liposomen, die mit 5 mM ONOO⁻ bei 37 °C inkubiert wurden. Zu verschiedenen Zeiten wurde 1 ml Reaktionslösung auf eine Sephadex® G 25-Säule gegeben und die eluierte Liposomenfraktion 20 min mit DPH-Suspension bei 37 °C inkubiert. Die Probe „0 min“ wurde 30 s nach ONOO⁻-Zugabe auf die Sephadex® G 25-Säule aufgetragen. Bei „Ref“ handelt es sich um zwei Proben, die jeweils mit NaOH versetzt und auf die Sephadex® G 25-Säule gegeben wurden. Weitere Informationen sind dem Text zu entnehmen. Mit $\lambda_{\text{ex}} = 382 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 435 \text{ nm}$ wurde vor jeder Messung der G-Faktor und anschließend \bar{r} bei 27,6 °C ermittelt. Die Werte stellen die Mittelwerte aus sieben Messwerten dar.

Zeit	0 min	75 min	14 h 30 min	36 h 30 min	Ref	Ref
\bar{r}	$0,158 \pm 0,013$	$0,172 \pm 0,013$	$0,203 \pm 0,020$	$0,288 \pm 0,023$	$0,156 \pm 0,008$	$0,160 \pm 0,019$

Wenn man die Proben „Ref“ und „0 min“ miteinander vergleicht, zeigt sich einerseits, dass man reproduzierbar \bar{r} bestimmen kann, trotz der Vielzahl der Arbeitsschritte bis zur eigentlichen Messung. Andererseits zeigt sich, dass der Einfluss von Peroxynitrit (PN) auf die Fluidität der Lipidphase nicht direkt nach Applikation der reaktiven Spezies detektierbar ist.

¹ Endkonzentration

Wenn man die Werte mit an DMPC-Liposomen ermittelten Werten vergleicht, erkennt man, dass die DLPC-Liposomen unter diesen Bedingungen als fluide Phase vorliegen. Die DPH-Moleküle können sich daher schnell bewegen mit der Folge niedriger Messwerte für \bar{r} .

Der Initiationsschritt der Lipidperoxidation (LPO) kann durch PN bewerkstelligt werden (*Radi et al., 1991b*), was in den signifikant erhöhten Werten der Fluoreszenzanisotropie bei längeren Inkubationszeiten zum Ausdruck kommt¹. Während dieser Zeit findet in der Lipidphase eine radikalische Kettenreaktion (siehe Abschnitt 3.1.1.3) statt (die nicht mehr auf die Anwesenheit von PN angewiesen ist!), die mit der Zeit die Membranfluidität beeinflusst.

Um die Zunahme der Modifikationen in der Lipidphase durch die LPO zusätzlich zu dokumentieren, wurde die Konzentration gebildeter Lipidhydroperoxide spektralphotometrisch mit dem Xylenolorange-Test erfasst (siehe Abschnitt 5.4.5). Eine weitere Methode, um das Ausmaß der LPO zu detektieren, ist die Messung der Absorption bei 232 nm. Bei dieser Wellenlänge absorbieren konjugierte Diene, die sich als Folge der LPO von mehrfach ungesättigten Fettsäuren bilden. Die Ergebnisse zu diesen Untersuchungen sind in Tabelle 6.2 und Abbildung 6.7 dargestellt.

Tabelle 6.2: Spektralphotometrische Messung von Lipidhydroperoxiden (LOOH) durch den Xylenolorange-Test (siehe Abschnitt 5.4.5); jeweils 50 μl der in Tabelle 6.1 beschriebenen Proben wurden mit 950 μl *FOX-Reagents* (siehe Seite 78) vermischt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Erstellung einer Eichgeraden wurde mit definierten Mengen H_2O_2 (5-25 μM)² durchgeführt. Unter Berücksichtigung der leicht variierenden Extinktionskoeffizienten ($\epsilon_{\text{Wasserstoffperoxid}} = 4,56 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; $\epsilon_{\text{Linolsäurehydroperoxid}} = 4,70 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) und der Voraussetzung, dass der Lipidgehalt (L) in allen Proben gleich groß war ($\sim 6 \mu\text{M}$)², wurden die Werte berechnet.

Probe	0 min	75 min	14 h 30 min	36 h 30 min	Ref	Ref
LOOH [μM]	0	0	$5,2 \pm 0,9$	$8,9 \pm 0,1$	0	0
LOOH / L (n/n)	0	0	0,9	1,5	0	0

¹ Normalerweise sind mehrfach ungesättigte Lipide von Anfang an mit Lipidhydroperoxiden kontaminiert, so dass allein durch Erwärmen die LPO als Folge der Verunreinigung mit Übergangsmetall-Kationen in ihre Propagationsphase treten würde. Die Inkubation mit PN beschleunigt diese Vorgänge.

² Konzentration nach Vermischen mit dem *FOX-Reagents*

Man kann anhand der Daten erkennen, dass durch die LPO die Bildung von LOOH als Funktion der Inkubationszeit zunimmt. Die LPO hat folglich mit zunehmender Reaktionszeit einen steigenden Einfluss sowohl auf die physikalischen als auch auf die chemischen Eigenschaften der Lipidphase. In den meisten Proben zeigt der Test an, dass scheinbar keine LOOH vorhanden sind, was aber an der Nachweisgrenze des Tests ($\text{LOOH} > 1 \mu\text{M}$)¹ liegt. Da außer Linolsäurehydroperoxid im Laufe der LPO sicherlich noch andere Hydroperoxidkomponenten (mit anderen Extinktionskoeffizienten) entstehen, werden die Ergebnisse nur semiquantitativ betrachtet.

Auch die Absorptionen bei 232 nm der in Abbildung 6.7 dargestellten UV-VIS-Spektren sollten nicht absolut betrachtet werden, da sie nicht ausschließlich auf die Bildung konjugierter Diene zurückzuführen ist.

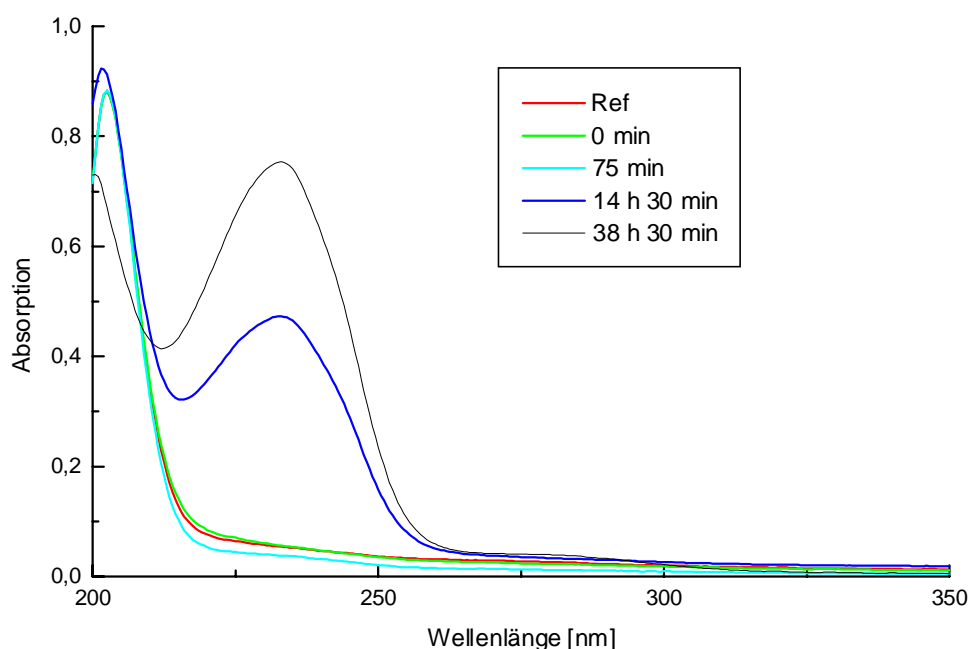


Abbildung 6.7: UV-VIS-Spektren der in Tabelle 6.1 beschriebenen Proben; 300 μl der Liposomensuspension ($\sim 30 \mu\text{g/ml} \hat{=} 40 \mu\text{M}$) wurden mit 700 μl Methanol gemischt. Nach 5 min wurden die UV-VIS-Spektren (350-200 nm) aufgenommen.

Wie zu erkennen ist, nimmt bei langer Inkubationszeit die Absorption bei 232 nm zu, was auf die Zunahme chemischer Modifikationen in der Lipidphase als Folge der LPO zurückzuführen ist. Wie bei dem Xylenolorange-Test lassen sich bei den Proben „Ref“, „0 min“ und „75 min“ noch keine Modifikationen erkennen (die etwas geringere Absorption bei „75 min“ dürfte mit sehr großer Wahrscheinlichkeit auf einen Verdünnungsfehler zurückzuführen sein). Dies liegt

¹ Konzentration nach Vermischen mit dem *FOX-Reagens*

an der nicht ausreichenden Sensitivität der Absorptionsmessung. Neben den konjugierten Dienen absorbieren andere Produkte der LPO ebenfalls im Bereich von 230 nm, wie z.B. Lipidhydroperoxide oder α,β -ungesättigte Aldehyde. Eine Quantifizierung der Modifikationen ist somit wie beim Xylenolorange-Test ebenfalls nicht möglich. Dennoch zeigen beide Tests übereinstimmend die tendenzielle Zunahme chemischer Modifikationen an den Lipiden mit fortschreitender Inkubationsdauer nach Zugabe von PN. Wenn man beide Tests mit der Messung von \bar{r} (siehe Tabelle 6.1) vergleicht, fällt auf, dass für die Probe „75 min“ noch keine chemischen Modifikationen detektiert werden können, während der Wert für \bar{r} dagegen schon leicht erhöht ist.

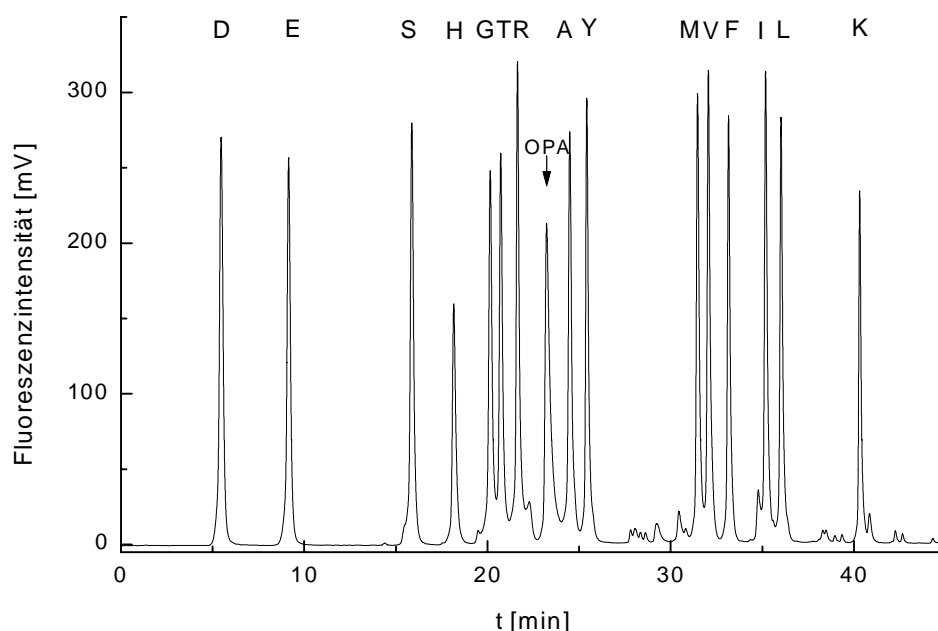
Wie bereits in Abschnitt 5.4.12 ausgeführt, misst man mit der steady-state Fluoreszenzanisotropie \bar{r} die Dynamik und den Ordnungsparameter eines Fluorophors, welche die „Fluidität“ der Umgebung (im vorliegenden Fall: der Lipidmembran) widerspiegeln. Auch wenn die steady-state Fluoreszenzanisotropie somit von zwei Parametern abhängt, besitzt man mit der Messung von \bar{r} eine Methode, die Veränderungen (chemischer und/oder physikalischer Natur) in der Lipidphase detektiert.

Die Ursache für die in der Membrantheorie des Alterns (siehe Abschnitt 3.1.1.5) postulierte Zunahme der Viskosität der Plasmamembran kann anhand von DLPC-Liposomen nicht näher untersucht werden. *In vivo* spielen neben der Reaktion von Lipidmolekülen mit reaktiven Spezies andere Parameter, wie z.B. die Cholesterinkonzentration, vielleicht eine sehr viel wichtigere Rolle. Außerdem sei noch einmal erwähnt, dass die Messung der steady-state Fluoreszenzanisotropie ein Maß für die Membranfluidität ist. Anhand der an DLPC-Liposomen erhaltenen Werte für \bar{r} kann man letztlich nur vermuten, dass deren zeitabhängige Zunahme letztlich auch auf eine steigende Membranviskosität hinweist.

6.4 RP-HPLC-Trennung und Quantifizierung von Aminosäuren

6.4.1 Derivatisierung mit *ortho*-Phthaldialdehyd

Mit Hilfe des Aminosäurestandards H (Fa. Pierce) wurde überprüft, inwiefern ein linearer Zusammenhang zwischen dem Fluoreszenz- bzw. UV-VIS-Signal und der Stoffmenge der eingesetzten Probensubstanz besteht. Vorversuche zur Derivatisierung der Aminosäuren mit *ortho*-Phthaldialdehyd (OPA) zeigten, dass abweichend von der Herstellervorschrift (*HPLC-Instruction Manual*) das Vermischen von neun Volumenanteilen Derivatisierungslösung mit einem Volumenanteil Aminosäurelösung notwendig ist. Das vom Hersteller angegebene Verhältnis von 1:1 ist nicht geeignet, um eine vollständige Derivatisierung zu gewährleisten. Da ein basischer pH-Wert essentiell für die Derivatisierungsreaktion ist (siehe Abschnitt 5.4.9.3), erscheint das Verhältnis von 1:1 ohnehin ungünstig, da der eingesetzte Aminosäurestandard in 0,1 M HCl vorliegt.



Säule: HPLC-Säule Microsorb™ Type O AAAAnalysis (Säulenmaterial 100-3 C18)

Probe: Aminosäurestandard H (Fa. Pierce) 1:100 mit 0,1 M HCl verdünnt mit OPA derivatisiert

Probenschleifenvolumen: 20 µl

Flussgeschwindigkeit: 1 ml/min

Gradient: siehe Abschnitt 5.4.9.3, Seite 84

Detektion: Fluoreszenz bei $\lambda_{\text{Ex}} = 340 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 455 \text{ nm}$

Abbildung 6.8: Chromatogramm des Aminosäurestandards H (Fa. Pierce); dieser wurde zuvor durch Vermischen von neun Volumenteilen OPA-Lösung (*Fluoraldehyde™ Reagent Solution*) mit einem Volumenteil Aminosäurestandard derivatisiert (siehe Abschnitt 5.4.9.3). Den Signalen ist die jeweilige Aminosäure im Einbuchstabencode (siehe Tabelle 3.4, Seite 54) zugeordnet. Die Stoffmenge der Aminosäuren betrug jeweils 50 Picomol. Die Retentionszeiten der einzelnen Signale sind Tabelle 6.3, Seite 117 zu entnehmen. Das Signal bei 23,1 min (Pfeil „OPA“) entspricht nicht umgesetzt OPA.

Den mit dieser Methode aufgenommenen Kalibrierungskurven, die im Anhang (siehe Abschnitt 8B, Seite 191) wiedergegeben sind, kann man entnehmen, dass im picomolaren Bereich für die meisten Aminosäuren ein linearer Zusammenhang zwischen Stoffmenge und Fluoreszenzintensität besteht. In Abbildung 6.8 ist das Chromatogramm dargestellt, das sich unter Verwendung des Aminosäurestandards H (Fa. Pierce) ergibt. Da in diesem die Aminosäuren Asparagin, Glutamin, Prolin und Tryptophan nicht vorhanden sind und Cystein mit OPA kein fluoreszierendes Derivat bildet, resultiert ein Chromatogramm mit 15 Signalen. Von den Aminosäuren Glycin (G), Threonin (T) und Arginin (R) wurden keine Kalibrierungskurven erstellt. Während für die meisten Aminosäuren gleiche Stoffmengen in etwa gleiche Signalflächen ergeben, sind die Signalflächen von Histidin und Lysin vergleichsweise kleiner (ca. 30 % geringer) und die von Asparaginsäure um ca. 20 % größer. Auch wenn Asparaginsäure in den sieben zur Erstellung der Kalibrierungskurven durchgeführten Läufen einen linearen Zusammenhang aufwies, gab es trotzdem bei weiteren HPLC-Läufen mehrmals ein deutliches Abweichen von diesem Verhalten. Als mögliche Ursache ist eine unvollständige Äquilibration der HPLC-Säule auf die Anfangsbedingungen in diesen Fällen denkbar. Dass die erhaltenen Signalflächen bei allen Aminosäuren ungefähr in der selben Größenordnung liegen, erscheint plausibel, da in die Bildung der fluoreszierenden Isoindolderivate lediglich die primäre Aminofunktion der Aminosäuren eingeht, deren chemische Eigenschaften durch die verschiedenen Aminosäurereste jedoch kaum beeinflusst wird. Bei dem Versuch, eine Kalibrierungskurve für Dityrosin aufzunehmen, zeigte sich, dass noch größere Mengen Tyrosin in der verwendeten Lösung vorhanden waren (Tyrosin wird als Edukt bei der Dityrosinsynthese eingesetzt). Eine Quantifizierung war daher nicht möglich. Es war jedoch möglich, die charakteristische Retentionszeit von Dityrosin zu ermitteln.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die HPLC-Methode mit vorheriger OPA-Derivatisierung im Rahmen dieser Arbeit zur qualitativen Detektion von Dityrosin und zur quantitativen Bestimmung von *ortho*-Tyrosin geeignet ist. Nimmt der Anteil von beispielsweise Tyrosin in einem Protein aufgrund der Bildung von Tyrosinderivaten, wie 3-Nitrotyrosin (NT) oder 3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA) ab, so lässt sich dies mit dieser Methode ebenfalls detektieren. Da bei der Bestimmung der Stoffmenge anhand der Kalibrierungskurven der Fehler bei ungefähr 5 % liegen kann, müssen Veränderungen in der Aminosäureverteilung eines Proteins jedoch im größeren Umfang stattfinden, um eindeutig nachgewiesen zu werden. Als ein Nachteil der RP-HPLC mit OPA-Derivatisierung und Fluoreszenzdetektion ist anzuführen, dass die Erstellung von Kalibrierungskurven für NT und DOPA nicht möglich ist, da diese (wie Cystein) keine fluoreszierenden Derivate bilden.

Tabelle 6.3: Zuordnung der Retentionszeiten der Signale aus Abbildung 6.8 zu den jeweiligen Aminosäuren; die Retentionszeit von Dityrosin und *ortho*-Tyrosin (nicht Bestandteil des Aminosäurestandards H) wurden in weiteren Chromatographieläufen untersucht.

Aminosäure	Retentionszeit [min]	Aminosäure	Retentionszeit [min]
Asparaginsäure	5,5	Dityrosin	26,6
Glutaminsäure	9,1	<i>ortho</i> -Tyrosin	30,8
Serin	15,9	Methionin	31,4
Histidin	18,2	Valin	32,1
Glycin	20,2	Phenylalanin	33,1
Threonin	20,8	Isoleucin	35,2
Arginin	21,7	Leucin	36,0
Alanin	24,5	Lysin	40,4
Tyrosin	25,5		

6.4.2 RP-HPLC-Trennung und UV-Detektion von aromatischen Aminosäuren

Zur Detektion von 3-Nitrotyrosin (NT), das mit OPA kein fluoreszierendes Derivat bildet und daher mit der vorhergenannten HPLC-Methode (siehe Abschnitt 6.4.1) nicht detektiert werden konnte, wurde die HPLC-Methode mit UV-Detektion bei $\lambda = 273$ nm durchgeführt. Die Kalibrierungskurven für Tyrosin und NT (siehe Abschnitt 8B, Seite 193) zeigen, dass bei identischer Stoffmenge die Signalfäche von NT um den Faktor 4,1 größer als die von Tyrosin (Y-Achsenabschnitt der Regressionsgeraden identisch!) ist. Die Retentionszeiten betragen 4,6 min für Tyrosin und 13,0 min für NT. Des Weiteren wurden die Retentionszeiten von 3,4-Dihydroxyphenylalanin (3,7 min) und *ortho*-Tyrosin (6,6 min) bestimmt.

6.5 Überprüfung auf vollständige Hydrolyse der untersuchten Proteine

Um zu kontrollieren, ob die Inkubationsbedingungen (20 h bei 120 °C in 6 M HCl) eine vollständige Hydrolyse der Peptidbindungen in die freien Aminosäuren gewährleisten, wurden die Proteinhydrolysate von BSA und BR untersucht. Die Proteinproben wurden zuvor keinem oxidativen Stress ausgesetzt, so dass die experimentell ermittelten Aminosäurezusammensetzungen mit den theoretischen Werten verglichen werden konnten. Hierzu wurden die ermittelten Stoffmengen einiger Aminosäuren mit der ermittelten Stoffmenge von Leucin ins Verhältnis gesetzt. Diese Aminosäuren wurden ausgewählt, da ihre Signale im Chromatogramm gut aufgelöst erscheinen (siehe Abbildung 6.8, Seite 115).

Tabelle 6.4: Quantitative Bestimmung einiger Aminosäuren von Bacteriorhodopsin- und Rinderserumalbumin-Hydrolysaten. Die Proteinlösungen wurden 20 h in 6 M HCl bei 120 °C inkubiert. Die Signale einiger Aminosäuren, die sich nach OPA-Derivatisierung und RP-HPLC fluorezenzspektroskopisch detektieren ließen (siehe Abschnitt 6.4), wurden mit Hilfe der Kalibrierungskurven (siehe Anhang 8B) quantifiziert und mit der ebenfalls ermittelten Stoffmenge von Leucin (61 Leucinreste in BSA, 36 Leucinreste in BR) ins Verhältnis gesetzt (Leucin dient somit als interner Standard). Die Messwerte stellen das gemittelte Resultat aus drei Messungen dar.

Bacteriorhodopsin			Rinderserumalbumin		
Aminosäure	ermittelt	theoretisch	Aminosäure	ermittelt	theoretisch
Lysin	6,7 ± 0,1	7	Lysin	56,5 ± 1,9	59
Isoleucin	15,6 ± 0,2	15	Isoleucin	16,6 ± 0,8	14
Phenylalanin	13,3 ± 0,3	13	Phenylalanin	26,2 ± 0,7	27
Valin	22,8 ± 0,3	21	Valin	35,0 ± 1,2	36
Tyrosin	8,9 ± 0,4	11	Tyrosin	16,0 ± 1,9	20
Alanin	30,6 ± 0,7	29	Alanin	46 ± 1,9	47
Serin	12,0 ± 0,4	13	Serin	23,3 ± 2,7	28
			Histidin	15,9 ± 0,5	17

Man kann anhand der Versuchsdaten aus Tabelle 6.4 erkennen, dass die Bedingungen zur vollständigen Hydrolyse beider Proteine scheinbar geeignet sind. Dies wird sowohl durch die Quantifizierung polarer Aminosäuren, wie Serin, als auch hydrophober Aminosäuren, wie Phenylalanin, bestätigt. Im Gegensatz zu den Messdaten mit dem Aminosäurestandard H (Fa. Pierce) fallen die Fehlergrenzen bei den selbst angefertigten Hydrolysaten jedoch größer aus. Im Fall von BR liegt der größte Fehler ausgerechnet bei Tyrosin vor ($\pm 4,5\%$). Für Tyrosin wird zudem die größte Abweichung des ermittelten (8,9) vom theoretischen Wert (11) gemessen. Bei BSA liegt der größte Fehler bei Serin vor (11,6 %). Der ermittelte Wert (23,3) unterscheidet sich auch stark vom theoretischen (28). Da bei BR die ermittelten Werte für Serin jedoch gut übereinstimmen, liegt wahrscheinlich kein methodischer Fehler vor. Bei Tyrosin fällt auf, dass sowohl die für BR als auch für BSA ermittelten Werte ca. 20 % unter dem theoretischen Wert liegen. Dieses Resultat kann zweierlei Ursachen haben: Einerseits könnte der Tyrosingehalt des Aminosäurestandards H (Fa. Pierce) falsch vom Hersteller angegeben sein, so dass eine falsche Kalibrierungskurve resultieren würde. Andererseits wäre es denkbar, dass der Tyrosingehalt während der sauren Hydrolyse abnimmt. Die Ergebnisse aus der RP-HPLC-Trennung mit UV-Detektion, bei der selbst hergestellte Standardlösungen zur

Erstellung der Kalibrierungskurven eingesetzt wurden, deuten darauf hin, dass die Tyrosinkonzentration durch die Hydrolysebedingungen abnimmt (siehe Abschnitt 6.7.2)!

Daher sind die Ergebnisse der quantitativen Bestimmung der NT-Reste/Protein mittels RP-HPLC nach OPA-Derivatisierung mit Vorsicht zu betrachten. Dies gilt auch für die Ergebnisse der isokratischen HPLC mit UV-Detektion. Zum qualitativen Nachweis von modifizierten Aminosäuren, wie Dityrosin oder *o*-Tyrosin, sind die RP-HPLC-Methoden sicherlich geeignet, da diese Substanzen nicht hydrolyseempfindlich sind. Weiterhin kann man innerhalb von Versuchsreihen (z.B. Variation der ONOO⁻-Konzentration bei Konstanz aller weiteren Parameter) tendenziell ermitteln, ob der NT-Gehalt zu- oder abnimmt.

6.6 ESI-MS zur Bestimmung der Molekülmasse von Bacterioopsin

Mit der Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) steht für die Untersuchung von Biopolymeren eine Methode zur Verfügung, mit der man vor allem auch Proteine in die Gasphase überführen und deren Molekülmasse mit sehr hoher Genauigkeit messen kann (siehe Abschnitt 5.4.11). Die Molekülmasse von Bacterioopsin (BO)¹ ist bekannt und wurde sogar schon mit ESI-MS verifiziert (*Hufnagel et al., 1996*). Diese Technik sollte in der Arbeit zur Ermittlung der Molekülmasse von BO eingesetzt werden, das zuvor mit Peroxynitrit behandelt wurde², um eine weitere Methode zur Quantifizierung von Modifikationen an den Aminosäuren durchzuführen. Bei geringer Anzahl von Modifikationen kann man eventuell sogar auf die Art der Modifizierung rückschließen (z.B. Hydroxlierung, Nitrierung).

Zur Etablierung der Methode wurde zuerst probiert, ob die korrekte Molekülmasse 26784 Da von unmodifiziertem BO mit ESI-MS zu bestimmen ist. Hierzu wurden zuerst die eingesetzten Lösungsmittel Chloroform, Methanol, Wasser und Ameisensäure einzeln und im Gemisch getestet. Die ESI-MS-Versuche an BO lieferten jedoch nicht das gewünschte Ergebnis. Es wurden Molekülmassen von 30994,1 Da bzw. in einem zweiten Versuch von 26241,2 Da ermittelt. Die detektierten Molekülmassen lassen sich weder durch unvollständig prozessiertes BR noch durch die häufig beobachtete Abspaltung des Carboxyterminus erklären. Daher wurde an dieser Stelle von weiteren Versuchen abgesehen.

¹ Bacterioopsin ist das Apoenzym ohne Retinal. Der Chromophor löst sich durch Zugabe des zum Entfernen der Lipide eingesetzten *n*-Hexan (siehe Abschnitt 5.4.11) aus dem Protein.

² Für die Reaktion mit Peroxynitrit wird das Holoenzym Bacteriorhodopsin eingesetzt. BO bildet sich erst durch die Zugabe von *n*-Hexan.

6.7 Reaktion von Peroxynitrit mit Rinderserumalbumin

Rinderserumalbumin (BSA) ist ein typischer Vertreter eines wasserlöslichen Proteins (siehe Abschnitt 3.3) und wurde daher ausgewählt, um es dem membranintegralen Protein Bacteriorhodopsin BR gegenüberzustellen. Da Membranproteine und wasserlösliche Proteine unterschiedliche chemische Eigenschaften aufweisen, ist auch anzunehmen, dass sie unterschiedliches Verhalten gegenüber Peroxynitrit zeigen.

Obwohl 3-Morpholinosydnonimin (SIN-1) Phenol nitriert (siehe Abschnitt 6.1), was auf die Bildung von Peroxynitrit schließen lässt, verliefen entsprechende Versuche an BSA erfolglos. Auf die Problematik bei dem Einsatz von SIN-1 wurde bereits in Abschnitt 5.3.6.1 hingewiesen. Daher wurde im folgenden synthetisiertes ONOO^- (siehe Abschnitt 5.3.4) eingesetzt.

6.7.1 Quantifizierung von 3-Nitrotyrosin durch UV-VIS-Spektroskopie

Abbildung 6.9 zeigt die UV-VIS-Spektren von unbehandeltem BSA und BSA-Proben, die mit 0,5 mM ONOO^- unter variierender Fe(III)-EDTA-Konzentration versetzt wurden. Das ONOO^- /Tyrosin-Verhältnis betrug in allen Ansätzen ca. 1,7. Nach dem Gelpermeationsschritt wurde der pH-Wert auf ca. 10,5 angehoben, so dass gebildetes Nitrotyrosin (NT) deprotoniert vorliegt (pK_S -Wert = 7,5). In dieser Form weist es verglichen mit der protonierten Form einen größeren Extinktionskoeffizienten auf und das Maximum ist rotverschoben. Während unbehandeltes BSA nur ein Absorptionsmaximum bei 280 nm besitzt (Trp+Tyr), zeigen die mit ONOO^- inkubierten Proben ein weiteres bei 430 nm, das auf die Bildung von NT hinweist.

Wie bereits in Abbildung 3.14, Seite 25 gezeigt, führt Peroxynitrit in Gegenwart des Fe(III)-EDTA-Komplexes vermehrt Nitrierungen durch. Die UV-VIS-Spektren lassen eine Zunahme der NT-Bildung mit steigender Fe(III)-EDTA-Konzentration erkennen. Da NT bei 280 nm einen größeren Extinktionskoeffizienten als Tyrosin besitzt, nimmt auch hier der Absorptionswert bei Bildung von NT aus Tyrosin zu. Durch den Gelpermeationsschritt, der zur Abtrennung der oxidierenden Spezies durchgeführt wird, kann es zu unterschiedlich starken Verdünnungen der Probelösung kommen. Die Probe „BSA“ ist ein bißchen höher konzentriert, wie man aus der relativ hohen Absorption bei 280 nm ableiten kann. Normalerweise tritt durch die Gelpermeation eine Verdünnung um einen Faktor von ca. 1,5 ein.

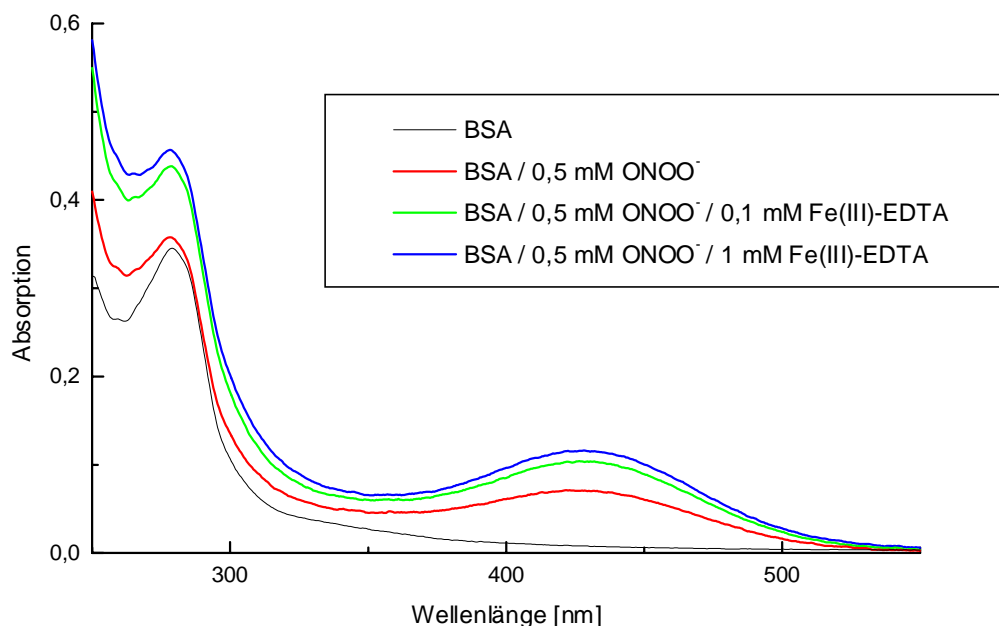


Abbildung 6.9: UV-VIS-Spektren von BSA und von BSA, das mit ONOO^- unter Variation der Fe(III)-EDTA-Konzentration inkubiert wurde: BSA (1 mg/ml) wurde mit 0,5 mM ONOO^- in 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) bei 37 °C vermischt (\rightarrow pH-Werterhöhung auf 7,5). Die Fe(III)-EDTA-Konzentration in den Ansätzen betrug 0 mM, 0,1 mM und 1 mM. Nach 5 min wurde das Protein durch Gelpermeation von dem oxidierenden Milieu getrennt (siehe Abschnitt 5.3.8). Als Eluens wurde hierbei *aqua bidest.* eingesetzt. Der pH-Wert der aufgefangenen Fraktionen wurde durch Zugabe von NaOH auf ca. 10,5 erhöht, bevor die UV-VIS-Messung durchgeführt wurde. Außerdem ist das Spektrum von unbehandeltem BSA in *aqua bidest.* bei pH 10,5 dargestellt.

Die anhand der UV-VIS-Spektren ermittelten NT-Konzentrationen und NT/BSA-Werte sind in Tabelle 6.5 dargestellt.

Tabelle 6.5: Einfluss variierender Fe(III)-EDTA-Konzentrationen bzw. 0,1 mM DTPA auf die Bildung von 3-Nitrotyrosin (NT) durch Zugabe von 0,5 mM ONOO^- zu BSA-Lösungen (1 mg/ml). Durch die Gelpermeation nimmt die BSA-Konzentration auf $\sim 0,7$ mg/ml ab. Die genauen Bedingungen sind Abbildung 6.9 zu entnehmen. Die Ermittlung der NT-Konzentration erfolgte durch Messung der Absorption bei 430 nm. Die Werte für 0 mM und 1 mM Fe(III)-EDTA stellen das gemittelte Resultat aus vier Messungen dar.

[Fe(III)-EDTA]	0 mM	0,1 mM	0,25 mM	0,5 mM	1 mM	0,1 mM DTPA
[NT]	$18 \pm 6 \mu\text{M}$	$24 \mu\text{M}$	$28 \mu\text{M}$	$30 \mu\text{M}$	$32 \pm 7 \mu\text{M}$	$11 \mu\text{M}$
NT/BSA	$1,7 \pm 0,5$	2,3	2,6	2,8	$3,1 \pm 0,6$	1,0

Die Anwesenheit von Fe(III)-EDTA erhöht die Nitrierungseffizienz von ONOO^- . DTPA hingegen führt zu einem gegenteiligen Effekt. Fe(III)-EDTA-Konzentrationen $> 0,25 \text{ mM}$ (verglichen mit „0 mM Fe(III)-EDTA“) resultieren in einer ca. 70 %-igen Zunahme der NT-Bildung. Mit der Einschränkung, dass anstelle von BSA 4-Hydroxyphenylacetat verwendet wurde, stehen diese Relationen in Einklang mit *Beckman et al. (1992)*. Wenn man die Bedingungen für die Nitrierung von BSA durch Peroxynitrit aus *Leeuwenburgh et al. (1997)* auf $0,5 \text{ mM ONOO}^-$ extrapoliert, ergibt sich für 1 mg/ml BSA in $50 \text{ mM Phosphatpuffer (pH 7,4)}$ und $0,1 \text{ mM DTPA}$ bei 37°C ein Wert von ungefähr $1,5 \pm 0,5 \text{ NT-Resten pro BSA-Molekül}$. Der vergleichbare Wert in der vorliegenden Arbeit von ca. 1 NT-Rest pro BSA-Molekül zeigt somit eine gute Übereinstimmung.

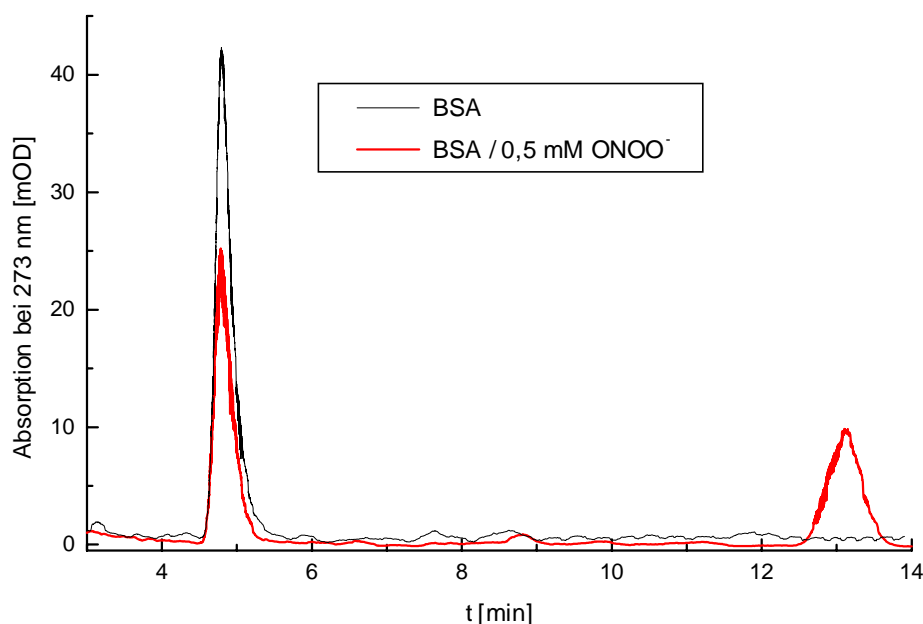
Bei 1 mg/ml BSA liegt eine Konzentration an Tyrosinresten von $\sim 0,3 \text{ mM}$ vor. Wenn 1-3 NT-Reste durch die eingestellten Konzentrationen gebildet werden (siehe Tabelle 6.5), entspricht dies einer Nitrierung von 5-15 % der möglichen Tyrosinreste. Die Nitrierungseffizienz des eingesetzten ONOO^- ($0,5 \text{ mM}$) beträgt hierbei 3-9 %.

6.7.2 Quantifizierung von 3-Nitrotyrosin durch UV-Detektion nach RP-HPLC

Um die spektroskopisch ermittelte Anzahl von NT in BSA (siehe Abschnitt 6.7.1) zu überprüfen, wurden die Proben hydrolysiert und der NT-Gehalt quantitativ mittels RP-HPLC-Trennung mit UV-Detektion bestimmt. Hierdurch konnte auch kontrolliert werden, ob neben Bildung von NT weitere Modifikationen an aromatischen Aminosäuren stattfanden.

Wie in Abbildung 6.10 exemplarisch dargestellt, liefert die HPLC-Methode mit UV-Detektion für die mit ONOO^- behandelte BSA-Probe zwei große Signale (das Einspritzsignal bei 2 min ist nicht dargestellt). Das Signal bei kurzen Retentionszeiten entspricht Tyrosin, das andere NT. BSA besitzt nur zwei Tryptophanreste (Trp), die durch die Inkubation mit 6 M HCl zerstört werden. Phenylalanin absorbiert bei der eingestellten Messwellenlänge nicht.

In dem Chromatogramm gibt es kein Anzeichen dafür, dass sich weitere Tyrosinderivate in größerem Umfang gebildet haben, wie etwa 3,4-Dihydroxyphenylalanin (Retentionszeit: 3,7 min) oder *ortho*-Tyrosin (Retentionszeit : 6,6 min). Dies steht in Einklang mit der Literatur. So konnte *Leeuwenburgh et al. (1997)* an dem System BSA/ ONOO^- zeigen, dass weitere Aminosäuremodifikationen neben NT $< 5 \%$ (bezogen auf die gebildete NT-Menge) sind.



Säule: HPLC-Säule Nucleosil (Säulenmaterial 20-5 C18)

Proben: Hydrolysat von BSA bzw. von mit 0,5 mM ONOO^- behandeltem BSA

Probenschleifenvolumen: 160 μl

Flussgeschwindigkeit: 1,5 ml/min

Detektion: Absorption bei $\lambda = 273 \text{ nm}$

Mobile Phase: 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ (pH 3,0); 3 % (v/v) Methanol

Abbildung 6.10: Einfluss von ONOO^- auf das Chromatogramm von BSA-Hydrolysaten (als Vergleich das Chromatogramm eines Hydrolysates von unbehandeltem BSA): BSA (1 mg/ml) wurde mit 0,5 mM ONOO^- in 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) bei 37 °C vermischt. Nach 5 min wurde das Protein durch Gelpermeation von dem oxidierenden Milieu getrennt (siehe Abschnitt 5.3.8) und in 6 M HCl hydrolysiert (siehe Abschnitt 5.4.8). Eine weitere BSA-Probe wurde mit Ausnahme der ONOO^- -Zugabe identisch behandelt.

Da kein interner Marker vorhanden ist, wurden die Chromatogramme nur qualitativ miteinander verglichen. Die Quantifizierung von NT oder Tyrosin erfolgte nicht durch den Vergleich von Chromatogrammen sondern über die Ermittlung des NT/Tyrosin-Verhältnisses in einem Chromatogramm. Unter der Voraussetzung, dass NT die einzig entstehende Tyrosinmodifikation ist, und der Tyrosingehalt durch die Hydrolyse in 6 M HCl bei 120 °C nicht beeinträchtigt wird, kann NT quantifiziert werden. Die quantitative Auswertung der NT-Bildung durch ONOO^- bei variierenden Mengen an Fe(III)-EDTA mit RP-HPLC und UV-Detektion ist in Abbildung 6.11 wiedergegeben.

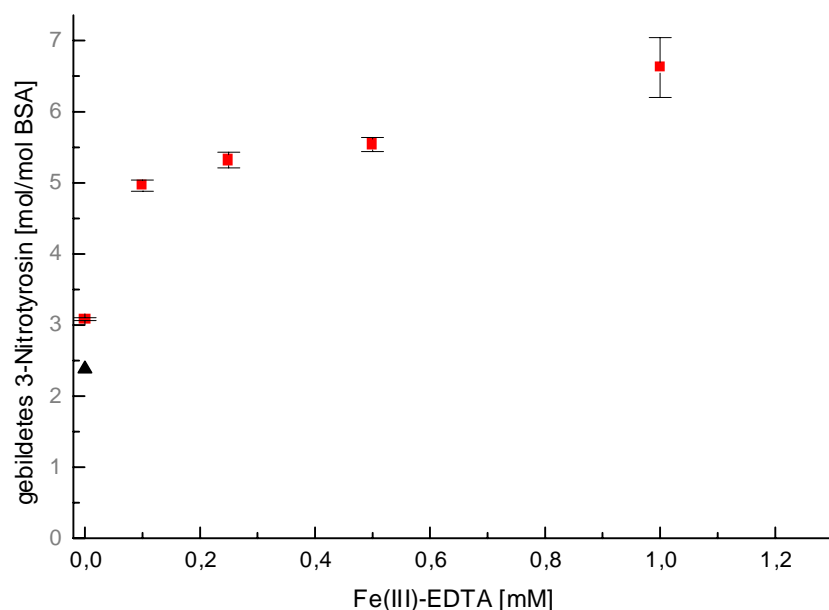


Abbildung 6.11: Einfluss variierender Fe(III)-EDTA-Konzentrationen (■) bzw. 0,1 mM DTPA (▲) auf den NT/BSA-Wert durch Zugabe von ONOO^- zu BSA-Lösungen: BSA (1 mg/ml) in 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) wurde bei variierender Fe(III)-EDTA-Konzentration (in Abwesenheit von DTPA) bzw. bei einer Konzentration von 0,1 mM DTPA mit 0,5 mM ONOO^- versetzt. Der pH-Wert erhöhte sich durch die Zugabe von Peroxynitrit auf 7,5. Die Reaktionstemperatur betrug 37 °C. Nach 5 min wurde das Protein durch Gelpermeation von dem oxidierenden Milieu getrennt (siehe Abschnitt 5.3.8), einer sauren Hydrolyse unterzogen (siehe Abschnitt 5.4.8) und der NT/BSA-Wert aus den Ergebnissen der RP-HPLC-Trennung mit UV-Detektion (siehe Abschnitt 5.4.9.4 und Anhang 8B) bestimmt. Die Ordinatenwerte sind absichtlich grau unterlegt, da die absoluten Zahlen um ca. den Faktor 2 von den aus den UV-VIS-Spektren ermittelten Werten abweichen (siehe Tabelle 6.6, Seite 128).

Die auf diese Art durchgeführte Quantifizierung von NT/BSA bestätigt tendenziell die Ergebnisse aus den UV-VIS-Spektren (siehe Abbildung 6.9). Die Anwesenheit von Fe(III)-EDTA führt bei BSA zu vermehrter Nitrierung von Tyrosin. Durch 1 mM Fe(III)-EDTA steigt der Anteil der durch 0,5 mM ONOO^- nitrierten Tyrosinreste von ca. 3 NT/BSA (ohne Fe(III)-EDTA) auf ca. 6 NT/BSA. Somit wird analog der Bestimmung aus den UV-VIS-Spektren (siehe Abschnitt 6.7.1) ungefähr eine Verdopplung des NT/BSA-Werts durch 1 mM Fe(III)-EDTA festgestellt. Die Abnahme der gebildeten NT-Menge durch Anwesenheit von DTPA wird ebenfalls bestätigt (ca. 2,5 NT/BSA).

Die absoluten Zahlen der nach den beiden Verfahren ermittelten NT/BSA-Werte unterscheiden sich ungefähr um den Faktor 2. Da die Kalibrierungskurven für die RP-HPLC mit UV-Detektion nicht mit dem Aminosäurestandard H (Fa. Pierce) erstellt wurden, sind die aus den Chromatogrammen abgeleiteten (zu hohen) Werte für NT/BSA, wie in bereits in

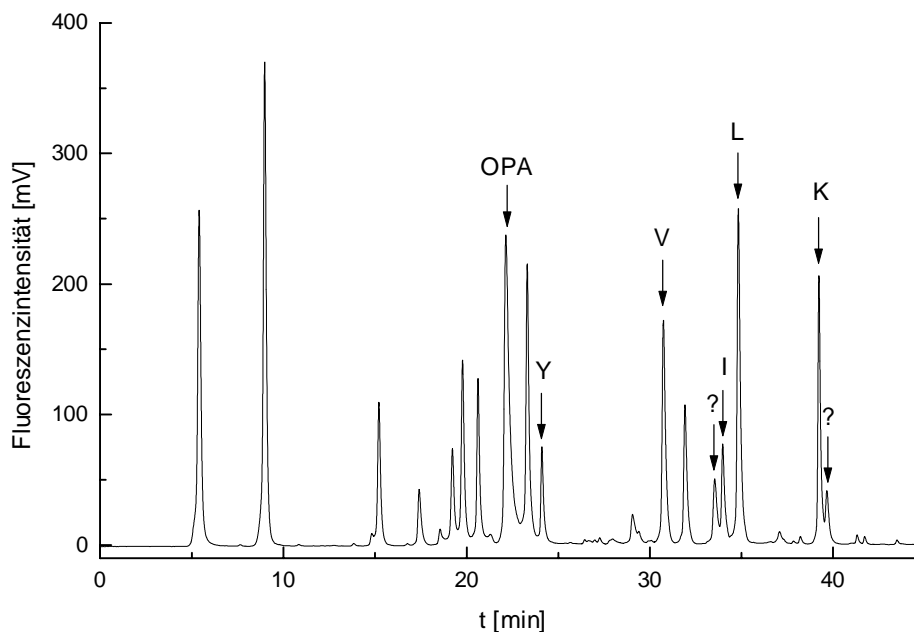
Abschnitt 6.5 vermutet, wahrscheinlich Folge des partiellen Abbaus von Tyrosin während der sauren Hydrolyse in 6 M HCl.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die NT-Detektion mittels RP-HPLC und UV-Detektion tendenziell die Ergebnisse der UV-VIS-Spektren bestätigt, die absoluten Zahlen aber ca. um den Faktor 2 voneinander abweichen.

6.7.3 Quantifizierung von 3-Nitrotyrosin durch Fluoreszenzmessung nach RP-HPLC

Zur weiteren Überprüfung der in Abschnitt 6.7.1 und 6.7.2 ermittelten Werte (bzw. der Vermutung, dass der Tyrosingehalt durch die saure Hydrolyse abnimmt) wurden mit einigen Hydrolysaten HPLC-Läufe mit vorheriger OPA-Derivatisierung durchgeführt. Ein typisches Chromatogramm ist in Abbildung 6.12 dargestellt. Das Signal von nicht umgesetztem OPA ist relativ groß, da die Stoffmenge der Aminosäuren hier geringer als bei der Vermessung des Standards (siehe Abbildung 6.8) war. Das Signal für Methionin ist nicht erkennbar, was darauf schließen lässt, dass die Proteinlösungen vor der Hydrolyse nicht sorgfältig genug entgast wurden. Schon geringe Mengen gelösten Sauerstoffs führen nämlich unter den Hydrolysebedingungen (6 M HCl, 120 °C, 20 h) zu einer kompletten Oxidation der Methioninreste. Aufgrund der geringen Stoffmengen treten nun die Signale neben Isoleucin (~ 34 min) und Lysin (~ 38 min) stärker hervor, die keiner Aminosäure zugeordnet werden konnten. Diese sind auch in Abbildung 6.8 als kleine Nebensignale erkennbar. Auch mit dieser RP-HPLC-Methode lässt sich analog der RP-HPLC mit UV-Detektion kein Hinweis auf eine weitere Modifikation ableiten.

Als interner Standard wurden die Aminosäuren Leucin und Valin verwendet, deren Gehalt trotz Inkubation mit ONOO^- als konstant gesetzt wurde. Diese beiden Aminosäuren wurden für diese Aufgabe ausgewählt, da sie über keine reaktiven Seitenketten verfügen und in großer Anzahl in BSA vorhanden sind.



Säule: HPLC-Säule Microsorb™ Type O AAAnalysis (Säulenmaterial 100-3 C18)

Probe: mit OPA derivatisiertes Hydrolysat von BSA, das mit ONOO^- behandelt wurde

Probenschleifenvolumen: 20 μl

Flussgeschwindigkeit: 1 ml/min

Gradient: siehe Abschnitt 5.4.9.3, Seite 84

Detektion: Fluoreszenz bei $\lambda_{\text{Ex}} = 340 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 455 \text{ nm}$

Abbildung 6.12: Chromatogramm eines Hydrolysates von BSA, das mit Peroxynitrit behandelt wurde. BSA (1 mg/ml) wurde mit 0,5 mM ONOO^- und 0,1 mM DTPA in 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) bei 37 °C vermischt. Nach 5 min wurde das Protein durch Gelpermeation von dem oxidierenden Milieu getrennt (siehe Abschnitt 5.3.8) und durch 6 M HCl hydrolysiert (siehe Abschnitt 5.4.8). Die Derivatisierung wurde durch Vermischen mit neun Volumenanteilen OPA-Lösung (*Fluoraldehyde™ Reagent Solution*) durchgeführt (siehe Abschnitt 5.4.9.3). Das Signal bei 22,7 min entspricht nicht umgesetztem OPA. Tyrosin (Y) ist bei ca. 24 min, Valin (V) bei ca. 32 min und Leucin (L) bei ca. 35 min zu erkennen. Isoleucin (I), Lysin (K) und die nicht identifizierten Signale (?) sind ebenfalls gekennzeichnet.

Nach *Alvarez et al. (1999)* sind in Proteinen die Aminosäuren Cystein, Methionin und Tryptophan die wichtigsten Reaktionspartner für Peroxynitrit, während die anderen Aminosäuren 1-3 Größenordnungen weniger reaktiv sind (was allerdings nicht bedeutet, dass das hochreaktive Intermediat ONOOH^* nicht auch mit diesen reagiert, wie im Fall von Tyrosin).

Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Steigungen und Y-Achsenabschnitte der ermittelten Kalibrierungskurven, die den Zusammenhang zwischen Stoffmenge und Fluoreszenzintensität beschreiben (siehe Anhang 8B), wurde das Verhältnis der Stoffmengen von Leucin, Valin und Tyrosin ermittelt. Unter der Voraussetzung, dass der Gehalt an Leucin und

Valin von Peroxynitrit unberührt bleibt, ergibt sich der NT/BSA-Wert indirekt aus der Differenz des normalerweise vorhandenen Valin/Tyrosin- bzw. Leucin/Tyrosin-Verhältnisses und dem tatsächlich gemessenen Verhältnis. Wie bereits erwähnt (siehe Abschnitt 6.4), fluoresziert das Isoindolderivat von NT nicht, so dass auf diese indirekte Bestimmungsmethode zurückgegriffen wurde. Je mehr Tyrosin in NT umgewandelt wurde, desto größer sollte das Leucin/Tyrosin- bzw. Valin/Tyrosin-Verhältnis ausfallen. Wenn der Tyrosingehalt durch die Hydrolysebedingungen abnimmt, resultiert hieraus eine Zunahme der eben erwähnten Verhältnisse mit der Folge, dass der hieraus berechnete NT/BSA-Wert zu hoch ist.

Die ermittelten NT/BSA-Werte sind in Tabelle 6.6 den Werten gegenübergestellt, in denen der NT-Gehalt durch RP-HPLC mit nachfolgender UV-Detektion (siehe Abschnitt 6.7.2) bzw. aus den UV-VIS-Spektren (siehe Abschnitt 6.7.1) bestimmt wurde.

Es zeigt sich, dass die RP-HPLC mit vorangehender OPA-Derivatisierung und anschließender Fluoreszenzdetektion die Ergebnisse der HPLC-Methode mit UV-Detektion bzw. der UV-VIS-Spektren tendenziell bestätigt. Die Zunahme der Nitrierungsreaktionen durch die Anwesenheit des Fe(III)-EDTA-Komplexes und die Abnahme der NT-Bildung durch Zugabe von DTPA wird festgestellt. Die absoluten Zahlenwerte des NT-Gehaltes fallen jedoch wie bei der HPLC-Methode mit UV-Detektion zu hoch aus, was die bereits in Abschnitt 6.5 aufgestellte Vermutung bestätigt, dass der Gehalt an Tyrosin durch die saure Hydrolyse abnimmt.

Das mit der OPA-Derivatisierung ermittelte Leucin/Valin-Verhältnis (L/V) ist trotz der variierenden Bedingungen in den einzelnen Ansätzen mit einer Ausnahme konstant, verglichen mit den Werten aus Tabelle 6.4 auf Seite 118 ($L/V = 1,7$) aber niedriger. Nach Alvarez *et al.*, (1999) sollte allerdings - wenn überhaupt - eher Valin als Leucin mit Peroxynitrit reagieren ($\rightarrow L/V \geq 1,7$). Die Ursache für dieses Ergebnis wurde im Verlauf der Arbeit nicht weiter erforscht. Bei Verwenden von Valin als internem Standard wurden daher stets höhere NT-Gehalte ermittelt als bei Verwendung von Leucin.

Tabelle 6.6: Vergleich der NT/BSA-Werte, die nach den in Abschnitt 5.4.9.3 und 5.4.9.4 beschriebenen RP-HPLC-Methoden bzw. aus den UV-VIS-Spektren (siehe Abschnitt 5.4.6) ermittelt wurden; NT wurde durch Inkubation von BSA (1 mg/ml) mit 0,5 mM ONOO⁻ bei An- und Abwesenheit von Fe(III)-EDTA- bzw. DTPA gebildet. Für weitere Angaben siehe Abbildung 6.11. BSA besitzt 20 Tyrosin- (Y), 36 Valin- (V) und 61 Leucinreste (L). Das Valin/Tyrosin-Verhältnis beträgt bei unbehandeltem BSA 1,80 und das Leucin/Tyrosin-Verhältnis 3,05.

	NT/BSA [mol/mol] UV-VIS-Spektrum	NT/BSA [mol/mol] RP-HPLC/UV-Detektion	Stoffmengenverhältnisse zwischen V, Y und L → NT/BSA [mol/mol] RP-HPLC/Fluoreszenzdetektion
0,1 mM DTPA	1,0	2,4	L/V = 1,56 L/Y = 3,53 → NT = 2,7 V/Y = 2,3 → NT = 4,3
0 mM Fe(III)-EDTA	1,7 ± 0,5	3,08 ± 0,02	L/V = 1,58 L/Y = 4,02 → NT = 4,8 V/Y = 2,55 → NT = 5,9
1 mM Fe(III)-EDTA	3,1 ± 0,6	6,6 ± 0,4	L/V = 1,24 L/Y = 4,42 → NT = 6,2 V/Y = 3,6 → NT = 10,0
			L/V = 1,52 L/Y = 4,31 → NT = 5,8 V/Y = 2,83 → NT = 7,3

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die beiden RP-HPLC-Methoden geeignet sind, um neben NT weitere Modifikationen zu detektieren. Die RP-HPLC mit UV-Detektion ist auch gut geeignet, um Tendenzen innerhalb von Versuchsreihen, in denen z.B. nur die Konzentration von ONOO⁻ variiert wird, aufzuzeigen. Zur Ermittlung absoluter Zahlen, wie des NT/BSA-Werts, können sie jedoch nicht herangezogen werden, da durch die gewählten Hydrolysebedingungen, die der RP-HPLC vorangingen, der Tyrosingehalt abnimmt. Daher wurden die NT/Protein-Werte stets aus den UV-VIS-Spektren (siehe Abschnitt 5.4.6) ermittelt.

6.8 Reaktion von Peroxynitrit mit Purpurmembran

Peroxynitrit (PN) kann auch Reaktionen in der Lipidphase durchführen. So kann es beispielsweise Lipidperoxidation induzieren (*Radi et al., 1991b*). Membranproteine sind potentielle Reaktionspartner von PN. Die Nitrierung von Tyrosinresten in der wässrigen Phase bzw. in der Lipidphase durch PN verlaufen aber wahrscheinlich unterschiedlich (*Goss et al., 1999*). *Zhang et al. (2001)* fanden bei langsamer Zugabe von Peroxynitrit eine signifikante Erhöhung der Nitrierung von Tyrosinresten, die in der Lipidphase lokalisiert sind, verglichen mit Tyrosinresten in wässriger Lösung.

Es liegen bisher nur wenige Untersuchungen vor, in denen die konkreten Modifikationen durch PN an Membranproteinen bestimmt wurden. Einige Experimente wurden an Membranfraktionen durchgeführt, ohne auf einzelne Proteine einzugehen (*Soszynski et al., 1997*, *Koppal et al., 1999*). Die innere Mitochondrienmembran mit den Atmungskomplexen stellt ein wichtiges Untersuchungsobjekt dar. Komplex I, Komplex II und die ATPase (Komplex V) werden durch PN inhibiert (*Radi et al., 1994*). Die genauen Mechanismen sind jedoch noch unklar. Modifikationen an Thiolresten oder Zerstörung von Eisen-Schwefel-Clustern werden diskutiert (*Boczkowski et al., 2001*). Ein viel untersuchtes Membranprotein ist die im sarcoplasmatischen Reticulum lokalisierte Ca^{2+} -ATPase. PN reagiert mit Cysteinresten, die wahrscheinlich im cytosolischen Teil des Proteins lokalisiert sind (*Viner et al., 2000*). Außerdem werden Tyrosinreste, die sich wahrscheinlich in transmembralen α -Helices befinden, zu 3-Nitrotyrosin (NT) modifiziert (*Viner et al., 1999*). Interessanterweise finden *in vivo* die Nitrierungsreaktionen nur an der SERCA2a-Isoform statt. Eine nähere Interpretation dieses Befunds scheitert an der noch unbekannten dreidimensionalen Struktur dieses Proteins, da bisher nur Strukturdaten bis zu einer Auflösung von 0,8 nm bekannt sind. An diesem Beispiel wird erneut deutlich, dass die Wahrscheinlichkeit, durch PN nitriert zu werden, nicht für alle Tyrosinreste in Proteinen gleich groß ist (siehe Abschnitt 3.1.1.2, Seite 25).

Versuche mit Purpurmembransuspensionen (PM), deren Bacteriorhodopsin (BR) mit seiner 7- α -helikalen Struktur ein bei Membranproteinen weitverbreitetes Strukturmotiv aufweist, sollten das Reaktionsvermögen von PN mit Membranproteinen aufzeigen. Im Gegensatz zu den bisher erforschten Membranproteinen ist die Struktur von BR bis zu einer Auflösung von 0,155 nm bekannt (*Lücke et al., 1999*). In PM liegt BR als zweidimensionaler Kristall vor (siehe Abschnitt 3.2). In dieser Anordnung sind viele Protein-Protein-Kontakte zwischen den einzelnen BR-Monomeren innerhalb der Trimeranordnung vorhanden.

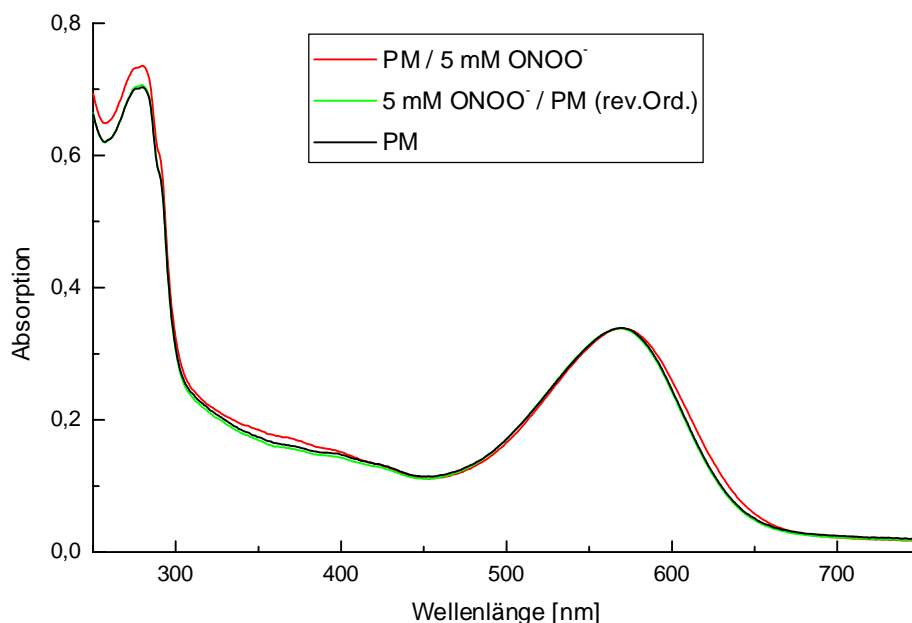


Abbildung 6.13: Einfluss von ONOO^- bzw. „zerfallenem ONOO^- “ auf das UV-VIS-Spektrum von PM; PM-Suspension (0,3 mg BR/ml) in 200 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) wurde bei 37 °C mit 5 mM ONOO^- versetzt („PM / 5 mM ONOO^- “). Die ONOO^- -Konzentration war somit 10 mal größer als bei den entsprechenden Versuchen mit BSA! Bei „5 mM ONOO^- / PM (rev.Ord.)“ wurde ONOO^- erst mit Puffer versetzt. Die Zugabe der PM-Suspension erfolgte, nachdem ONOO^- zu Nitrat isomerisiert war. „PM-Referenz“ wurde genauso wie die anderen Proben behandelt mit der Ausnahme, dass anstelle von ONOO^- 10 mM NaOH zupipettiert wurde (ONOO^- -Stammlösung ist basisch). Der pH-Wert erhöhte sich durch die Zugabe von ONOO^- bzw. NaOH auf 7,5. Anschließend wurden die Proben auf eine Gelpermeationssäule aufgegeben (siehe Abschnitt 5.3.8). Als Eluens wurde hierbei 10 mM Phosphatpuffer (pH 6,0) verwendet. Anschließend wurden die UV-VIS-Spektren aufgenommen.

Abbildung 6.13 zeigt exemplarisch die UV-VIS-Spektren von PM-Suspensionen, die unterschiedlich behandelt wurden. Durch die vorangegangene Gelpermeation wurde die PM-Suspension von Nitrit, Nitrat und Wasserstoffperoxid bzw. NaOH befreit. Gleichzeitig fand hierdurch jedoch auch eine Verdünnung statt, die von Probe zu Probe leicht variieren kann. Die Absorptionsbande mit dem Maximum bei 568 nm, die dem Chromophor Retinal zuzuordnen ist, wird durch Inkubation mit ONOO^- geringfügig zu längeren Wellenlängen verschoben. Im Bereich von 250-400 nm zeigt die mit 5 mM ONOO^- behandelte Probe eine leicht erhöhte Absorption, die auf die Bildung geringer Mengen 3-Nitrotyrosin (NT) zurückzuführen ist. Wenn man den Graph „PM“ von „PM/5 mM ONOO^- “ abzieht, resultiert zwischen 300-500 nm ein Differenzspektrum, das ein Maximum bei 360 nm besitzt. Durch Erhöhen des pH-Wertes auf 11,5 ergibt sich ein Differenzspektrum mit einem Maximum bei

445 nm (die protonierte Form von NT hat ein Absorptionsmaximum bei 430 nm), während das Maximum bei 360 nm verschwindet. Daher ist wahrscheinlich NT für die spektralen Unterschiede bei 360 nm in Abbildung 6.13 verantwortlich. Die Denaturierung eines kleinen Anteils von BR-Molekülen durch PN, die zur Freisetzung des Chromophors Retinal aus der Proteinbindungstasche führen könnte (das ein Absorptionsmaximum bei ca. 370 nm aufweist), ließ sich nicht von vornherein ausschließen.

Die bei PM durch Alkalisierung verursachte Blauverschiebung (siehe Abschnitt 3.2.1) des Retinalsignals (apparenter pK_S -Wert = 12,0) ist teilweise für das Signal im Differenzspektrum bei 440 nm verantwortlich. Dies tritt vor allem dann ein, wenn sich der pK_S -Wert (der Blauverschiebung) durch Bildung von NT erniedrigt, wie das bereits erwähnte Beispiel der Nitrierung des Tyrosinrests 26 zeigt (siehe Abschnitt 3.2.1). Die Ermittlung des NT/BR-Werts bei basischem pH-Wert, die aufgrund des höheren Extinktionskoeffizienten von deprotoniertem NT sonst bevorzugt durchgeführt wird, ist somit im Fall von BR nicht möglich.

Der Vergleich der Proben „PM“ mit „5 mM $ONOO^-$ /PM (rev.Ord.)“ zeigt, dass PM weder mit H_2O_2 noch mit Nitrit oder Nitrat Reaktionen eingeht. Das zugehörige UV-VIS-Spektrum bleibt unverändert. Eine Bestimmung der Konzentration von gebildeten NT mit Hilfe der UV-VIS-Spektren (siehe Abschnitt 5.4.6) zeigt, dass sich bei der Probe „PM/5 mM $ONOO^-$ “ $\sim 4 \mu M$ NT gebildet haben. Die gebildete Menge an NT liegt somit an der unteren Nachweisgrenze dieser Methode. Die Bestimmung der BR-Konzentration mit Hilfe von $\epsilon_{568nm} = 63000 M^{-1}cm^{-1}$ liefert schließlich einen Wert von $\sim 0,8$ NT-Resten pro BR-Molekül (NT/BR). Man kann zudem noch weitere Informationen aus den Spektren ziehen: Der Chromophor Retinal scheint mit seinem oxidationsempfindlichen Doppelbindungssystem in PM gut geschützt vor Reaktionen mit PN zu sein, da die Absorptionsbande mit dem Maximum bei 568 nm sich nur geringfügig verändert. Somit dürfte auch die u.a. aus vier Tryptophanresten gebildete, hydrophobe Bindungstasche des Retinals (*Oesterhelt, 1998*) unverändert aus der Inkubation mit PN hervorgehen. Modifikationen an Aminosäuren in der unmittelbaren Umgebung des Retinals würden dessen spektrale Eigenschaften sicherlich stärker beeinflussen. Die Zunahme der Absorption bei 280 nm ist ebenfalls durch die Bildung von NT aus Tyrosin erklärbar. Aufgrund dieser Fakten liegt die Vermutung nahe, dass PN mit den anderen aromatischen Aminosäuren keine Reaktion in nennenswertem Umfang eingeht.

Da die Absorptionsänderungen infolge der geringen NT-Bildung nur sehr klein ausfallen, wurden PM-Suspensionen, die mit variierender $ONOO^-$ -Menge versetzt wurden, einer Proteinhydrolyse unterzogen. Anschließend wurde das Hydrolysat mit Hilfe von RP-HPLC aufgetrennt und die aromatischen Aminosäuren durch UV-Detektion quantifiziert. Die

Signalflächen für Tyrosin und NT wurden unter Berücksichtigung des Faktors 4,1 (siehe Tabelle 8.2, Seite 193) ins Verhältnis gesetzt. Unter der Voraussetzung, dass ausschließlich die Reaktion von Tyrosin zu NT stattfindet und keine weiteren Tyrosinderivate gebildet werden, lässt sich ermitteln, wieviele der 11 Tyrosinreste von BR in NT umgewandelt wurden. Wie bereits erwähnt (siehe Abschnitt 6.7.2), liefert dieses Verfahren jedoch zu hohe NT-Werte, da der Tyrosingehalt durch die Hydrolyse abnimmt. Genauso wie bei BSA konnten auch bei PM keine weiteren Modifikationen durch die in dieser Arbeit eingesetzten HPLC-Methoden detektiert werden. Abbildung 6.14 zeigt, dass durch Konzentrationen ≥ 2 mM ONOO^- maximal 1,3 der 11 Tyrosinreste von BR (siehe Abbildung 3.42) zu NT umgewandelt werden. Analog den Ergebnissen an BSA unterscheiden sich der aus den UV-VIS-Spektren und der mit Hilfe der RP-HPLC mit UV-Detektion ermittelte NT/BR-Wert ungefähr um den Faktor 2. In dem Proteinhydrolysat von BR, zu dem kein ONOO^- zugegeben wurde, ließ sich kein NT nachweisen. Auch das Proteinhydrolysat von BR, bei dem Phosphatpuffer und 5 mM ONOO^- vorgelegt wurden und erst nach dessen vollständigem Zerfall Protein zugefügt wurde („rev.Ord.“), zeigte kein Signal für NT im Chromatogramm. Somit konnte nachgewiesen werden, dass die Bildung von NT in BR auf die Reaktion von Peroxynitrit mit Tyrosin zurückzuführen ist.

Abbildung 6.14 zeigt, dass man im Vergleich zu BSA höhere ONOO^- -Konzentrationen benötigt, um Tyrosinreste in BR zu nitrieren. Oberhalb ca. 2 mM führt eine weitere Erhöhung der ONOO^- -Konzentration zu keinem signifikanten Ansteigen des NT/BR-Werts.

Der aus dem UV-VIS-Spektrum (siehe Abbildung 6.13) erhaltene Messwert von 0,8 gebildeten NT-Resten in BR zeigt, dass die Tyrosinreste von BR in der Purpurmembran verglichen mit denen von BSA (siehe Abschnitt 6.5) sehr viel besser vor Nitrierungen durch PN geschützt sind (ONOO^- -Konzentration bei Versuchen mit PM 10 mal höher als im Fall von BSA). Bei einer 5 mM Endkonzentration von ONOO^- ($\text{ONOO}^-/\text{Tyrosinreste} \sim 41$) werden nur ca. 0,8 Tyrosinreste (~ 7 % der 11 Tyrosinreste in BR) nitriert ($\sim 0,2$ % des eingesetzten ONOO^- reagieren zu NT). Bei BSA hingegen wurden bei Abwesenheit von Fe(III)-EDTA durch 0,5 mM ONOO^- ($\text{ONOO}^-/\text{Tyrosinreste} \sim 1,7$) ca. 1,7 Tyrosinreste (~ 9 % der 20 Tyrosinreste in BSA) nitriert (~ 5 % des eingesetzten ONOO^- reagieren zu NT).

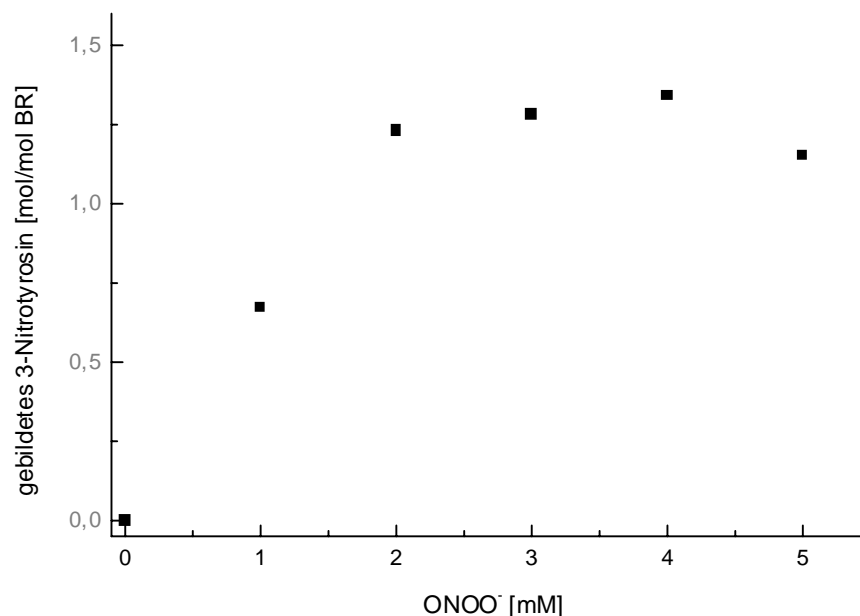


Abbildung 6.14: Bildung von 3-Nitrotyrosin durch Zugabe von 5 mM ONOO^- zu PM-Suspension (0,3 mg BR/ml) in 200 mM Phosphatpuffer (pH 7,4); der pH-Wert erhöhte sich durch die Zugabe von Peroxynitrit auf 7,5. Nach 5 min wurde das Protein durch Gelpermeation von dem oxidierenden Milieu getrennt (siehe Abschnitt 5.3.8), einer sauren Hydrolyse unterzogen (siehe Abschnitt 5.4.8) und der NT/BR-Wert durch RP-HPLC mit UV-Detektion (siehe Abschnitt 5.4.9.4 und Anhang 8B) bestimmt. Die Ordinatenwerte, die den NT/BR-Wert anzeigen, sind absichtlich grau unterlegt, da die absoluten Zahlenwerte ungefähr um den Faktor 2 von den Werten abweichen, die aus den UV-VIS-Spektren ermittelt wurden (siehe Abschnitt 6.7.2). Die Reaktionstemperatur betrug 37 °C.

Diese Messungen ermöglichen keine Aussagen darüber, welche der 11 Tyrosinreste in BR gut zugänglich für Nitrierungsreaktionen sind. Es ist möglich, dass ein Tyrosinrest nahezu vollständig zu NT umgewandelt wird, während die anderen 10 Tyrosinreste kaum oder gar nicht reagieren. Andererseits könnten theoretisch alle Tyrosinreste zu einem geringen Prozentsatz zu NT umgewandelt werden. Zwischen diesen zwei Extremvarianten gibt es eine Vielzahl weiterer Möglichkeiten.

Der Vergleich mit der Literatur (siehe Abschnitt 3.2.1) schließt die Nitrierung von Y 64 aus, da dessen Bildung mit einer Blauverschiebung des Absorptionsmaximums nach 535 nm verbunden wäre (Scherrer *et al.*, 1984). Auch die Nitrierung von Y 26 scheint eher unwahrscheinlich, da dann bei pH 11,5 die Blauverschiebung des Retinalsignals nach 460-470 nm deutlicher sichtbar sein sollte (siehe Abbildung 6.40, Seite 164).

Um den Einfluss von PN auf die Funktion von PM zu untersuchen, wurde die Photozykluskinetik der Proben mit einem Blitzlicht-Absorptionsspektrometer untersucht. In

Tabelle 6.7 sind die Ergebnisse zusammengefasst, welche die Anpassung mit zwei Exponentialfunktionen an die zeitabhängigen Absorptionsänderungen bei 412 nm liefert.

Tabelle 6.7: Zeitkonstanten der M-Intermediatkinetik von BR in PM (20 °C) die mit variierenden ONOO⁻-Konzentrationen behandelt wurde (siehe auch Abbildung 6.15); die Zeitkonstanten wurden aus einer Anpassung mit der Summe von zwei Exponentialfunktionen erhalten (siehe Abschnitt 5.5.3). „rev.Ord.“ bedeutet, dass ONOO⁻ erst mit Puffer und dann mit Proteinlösung versetzt wurde. „Ref.“ ist PM, die nicht mit PN inkubiert wurde (Anpassung mit fünf Exponentialtermen siehe Anhang 8C, Tabelle 8.3).

ONOO ⁻ [mM]	1	2	3	4	5	(rev.Ord.) 5	Ref.
$\tau_{\text{Entstehung}}$ [μs]	100	118	135	132	137	94	93
τ_{Zerfall} [ms]	12,2	14,4	16,7	15,5	17	9,7	9,1

Bei Vergleich der unterschiedlichen Zeitkonstanten fällt auf, dass die Entstehung und der Zerfall des M-Intermediats bei der Referenz und der „rev.Ord.“-Probe am schnellsten stattfinden. Der Vergleich der zwei Extremfälle dieser Untersuchung (Ref. \leftrightarrow 5 mM ONOO⁻) offenbart bei der Probe, die mit 5 mM ONOO⁻ inkubiert wurde, eine Abnahme der Geschwindigkeitskonstante der Bildung des M-Intermediats um den Faktor 1,5 (siehe Abbildung 6.15). Die Geschwindigkeitskonstante des Zerfalls des M-Intermediats wird um den Faktor 1,9 reduziert. Die „rev.Ord.“-Probe zeigt genauso wie die HPLC-Messungen, dass Nitrit, Nitrat und Wasserstoffperoxid PM nur wenig modifizieren. Konzentrationen größer 3 mM ONOO⁻ führen zu keiner weiteren signifikanten Abnahme der Geschwindigkeitskonstanten, wie man Abbildung 6.16 entnehmen kann.

Der Vergleich mit den ermittelten Zahlenwerten für NT/BR (siehe Abbildung 6.14) legt die Vermutung nahe, dass es einen Zusammenhang zwischen der Tyrosinnitrierung und der Abnahme der Geschwindigkeitskonstanten gibt. Es findet sich eine Übereinstimmung mit den Daten von Scherrer *et al.* (1985) für die M-Intermediatkinetik von BR, dessen Tyrosinrest 26 nitriert ist (Literatur: geringfügige Verlangsamung der Geschwindigkeitskonstante für die Entstehung des M-Intermediats um den Faktor 1,07; Zerfall um den Faktor 2-4 verlangsamt). Die Bildung von NT 64 dagegen wird auch durch die Kinetikdaten widerlegt, da für diesen Fall eine geringfügige Beschleunigung der Entstehung des M-Intermediats beschrieben wurde.

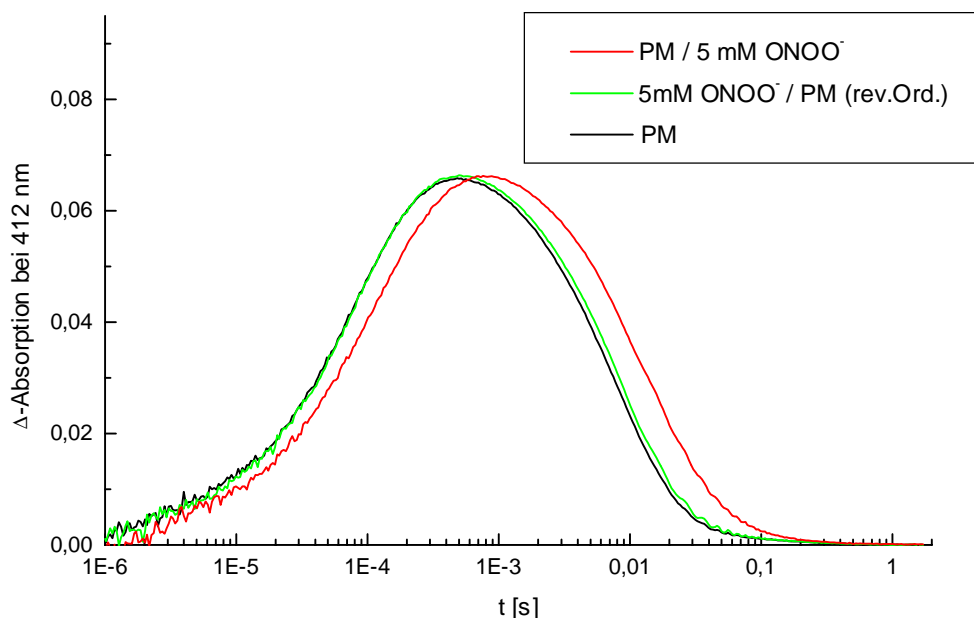


Abbildung 6.15: Zeitabhängige Messung der lichtinduzierten Entstehung und des Zerfalls des M-Intermediats von BR in PM in 10 mM Phosphatpuffer (pH 6,0) mit Hilfe des Blitzlichtspektrometers bei 20 °C; PM (0,3 mg BR/ml) in 200 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) wurde mit den angegebenen Konzentrationen an ONOO^- versetzt („rev.Ord.“ bedeutet, dass ONOO^- erst mit Puffer und dann mit Proteinlösung versetzt wurde). Nach 5 min wurde das Protein durch Gelpermeation von dem oxidierenden Milieu mit 10 mM Phosphatpuffer (pH 6,0) als Eluens getrennt (siehe Abschnitt 5.3.8). Die Amplituden wurden normiert, um die Änderungen in der Kinetik besser zu veranschaulichen.

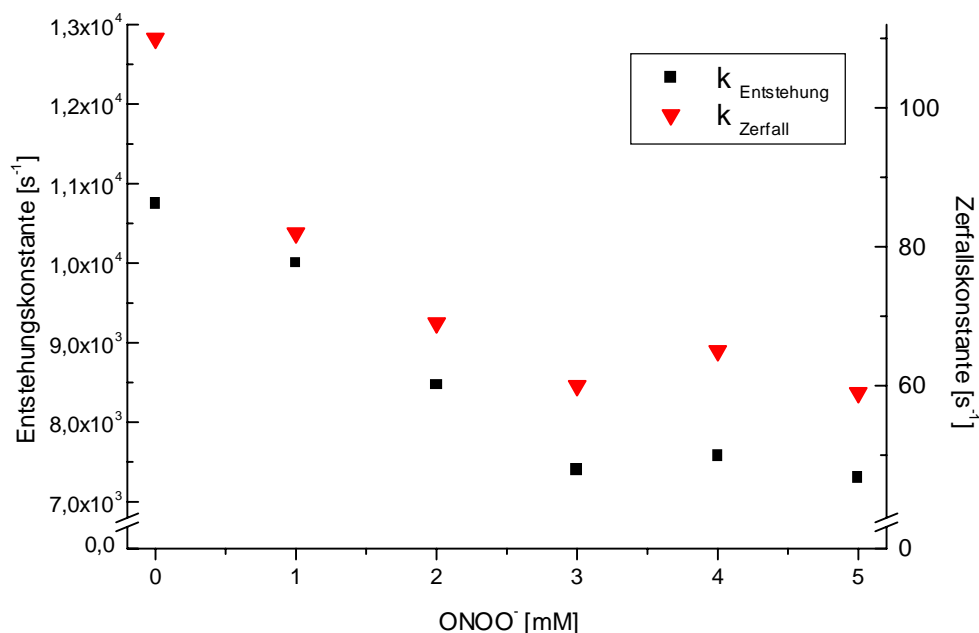


Abbildung 6.16: Einfluss variierender ONOO^- -Konzentrationen auf die Geschwindigkeitskonstanten der Bildung und des Zerfalls des M-Intermediats von BR in PM; PM (0,3 mg BR/ml) in 200 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) wurde mit den angegebenen ONOO^- -Konzentrationen versetzt. Nach 5 min wurde das Protein durch Gelpermeation von dem oxidierenden Milieu getrennt (siehe Abschnitt 5.3.8). Die Messung der M-Intermediatkinetik der Proben wurde mit Hilfe des Blitzlichtspektrometers in 10 mM Phosphatpuffer (pH 6,0) bei 20 °C durchgeführt.

Um die Reproduzierbarkeit der erhaltenen Werte zu überprüfen, wurden ähnliche Versuche ein weiteres mal an Proben durchgeführt, die jedoch eine geringere BR-Konzentration von 0,2 mg/ml aufwiesen (vorher 0,3 mg/ml). Trotz dieser Variation wurden ungefähr gleiche Werte für die Zeitkonstanten erhalten. Die Fehlerbalken der in Abbildung 6.17 gezeigten gemittelten Werte betragen maximal $\pm 6\%$. Die Werte bei 0 mM ONOO^- entsprechen nativer PM und weisen ebenfalls Fehlerbalken ($< \pm 2\%$) auf. Abbildung 6.17 zeigt, dass die Kinetik der Entstehung und des Zerfalls des M-Intermediats von BR in PM durch Zugabe von ONOO^- reproduzierbar verändert werden kann.

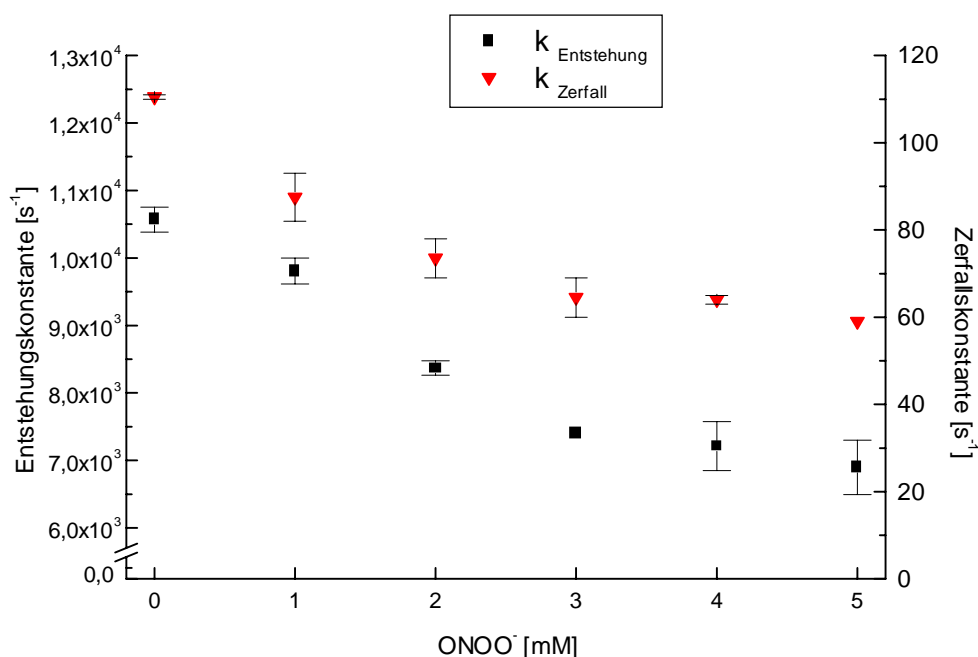


Abbildung 6.17: Einfluss variierender ONOO^- -Konzentrationen auf die Geschwindigkeitskonstanten der Bildung und des Zerfalls des M-Intermediats von BR in PM; die dargestellten Messpunkte sind das gemittelte Ergebnis aus zwei Versuchsreihen, in denen PM mit ONOO^- versetzt wurde. Die Versuchsbedingungen waren analog Abbildung 6.16 mit der Ausnahme, dass bei einer Versuchsreihe der BR-Gehalt nur 0,2 mg/ml betrug. Der Vergleich der gemittelten Werte von nativer PM (0 mM ONOO^-) mit PM, die mit 5 mM ONOO^- versetzt wurde, zeigt eine Abnahme der Geschwindigkeitskonstanten der Entstehung bzw. des Zerfalls des M-Intermediats um den Faktor 1,5 bzw. 1,9 durch 5 mM ONOO^- (siehe Tabelle 6.7).

In weiteren Versuchen wurde der Einfluss von 5 mM ONOO^- auf PM bei variierenden Fe(III)-EDTA-Konzentrationen bzw. 0,1 mM DTPA untersucht. In Abbildung 6.18 sind die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten für die Entstehung und den Zerfall des M-Intermediats dargestellt (Anpassung mit fünf Exponentialtermen siehe Abschnitt 8C, Tabelle 8.5).

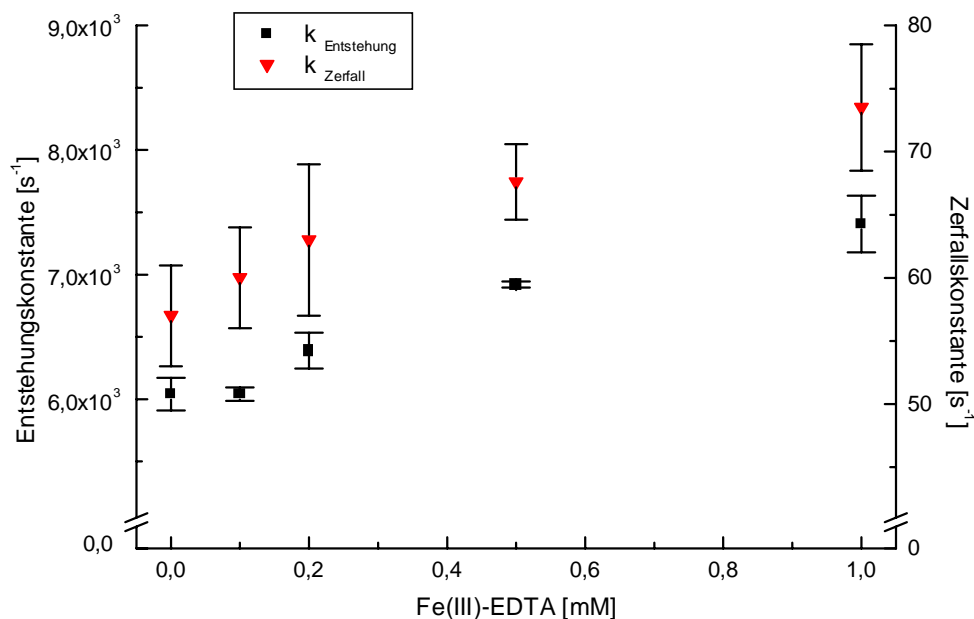


Abbildung 6.18: Einfluss von 5 mM ONOO^- bei variierender Fe(III)-EDTA-Konzentrationen auf die Geschwindigkeitskonstanten der Entstehung und des Zerfalls des M-Intermediats von BR in PM; PM (0,3 mg BR/ml) in 200 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) wurde unter Variation der Fe(III)-EDTA-Konzentrationen mit 5 mM ONOO^- bei 37 °C inkubiert. Nach 5 min wurde das Protein durch Gelpermeation von dem oxidierenden Milieu mit 10 mM Phosphatpuffer (pH 6,0) als mobiler Phase getrennt (siehe Abschnitt 5.3.8). Die zeitabhängigen Absorptionsänderungen wurden bei 412 nm und 20 °C aufgenommen. Die dargestellten Messpunkte sind das gemittelte Ergebnis von zwei Versuchsreihen. Die Werte für unbehandelte PM betragen $k = 1,02 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ und $k = 116 \text{ s}^{-1}$. Für PM, die mit 1 mM Fe(III)-EDTA unter „rev.Ord.“-Bedingungen (ONOO^- + Puffer/Fe(III)-EDTA und erst nach Zerfall von ONOO^- Zugabe des Proteins) inkubiert worden ist, wurde $k = 1,02 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ und $k = 117 \text{ s}^{-1}$ gemessen. PM, die in Anwesenheit von 0,1 mM DTPA mit ONOO^- inkubiert wurde, ergab Werte von $k = 6,1 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ und $k = 58 \text{ s}^{-1}$.

Man kann in Abbildung 6.18 erkennen, dass Konzentrationen $< 0,2 \text{ mM}$ Fe(III)-EDTA bzw. 0,1 mM DTPA für die Entstehungskinetik des M-Intermediats ohne Effekt bleiben, während bei Fe(III)-EDTA-Konzentrationen $\geq 0,2 \text{ mM}$ der Einfluss von 5 mM ONOO^- auf BR in PM abgeschwächt wird. Bei der Zerfallskinetik ist diese Abschwächung schon bei Konzentrationen $< 0,2 \text{ mM}$ zu beobachten. Die Geschwindigkeitskonstante für die Entstehung des M-Intermediats von BR, das mit 5 mM ONOO^- / 1 mM Fe(III)-EDTA inkubiert wurde, erhöht sich (vgl. mit 5 mM ONOO^- / 0 mM Fe(III)-EDTA) um den Faktor $\sim 1,2$ und für den Zerfall um den Faktor $\sim 1,3$. Die Hydrolyse und nachfolgende RP-HPLC mit UV-Detektion zeigten keine signifikante Änderung der NT-Bildung in Abhängigkeit von der Fe(III)-EDTA-Konzentration. Die in Abbildung 6.19 gezeigten Werte, die durch Analyse der UV-VIS-Spektren erhalten wurden, weisen auch nur sehr geringe Abnahmen des NT/BR-Wertes mit steigender Fe(III)-EDTA-Konzentration auf. Diese müssen jedoch mit Vorsicht betrachtet werden, da die

Unterschiede in den UV-VIS-Spektren im milliOD-Bereich liegen. Diese Unsicherheit zeigt sich deutlich bei dem NT/BR-Wert in Abwesenheit von Fe(III)-EDTA. Der in Abbildung 6.13 gezeigte NT/BR-Wert betrug trotz identischer Bedingungen 0,8 NT/BR anstatt 1,2 NT/BR (siehe Abbildung 6.19). Somit liegen die unterschiedlichen Werte aus Abbildung 6.19 deutlich innerhalb der Fehlergrenzen der Bestimmungsmethode aus dem UV-VIS-Spektrum.

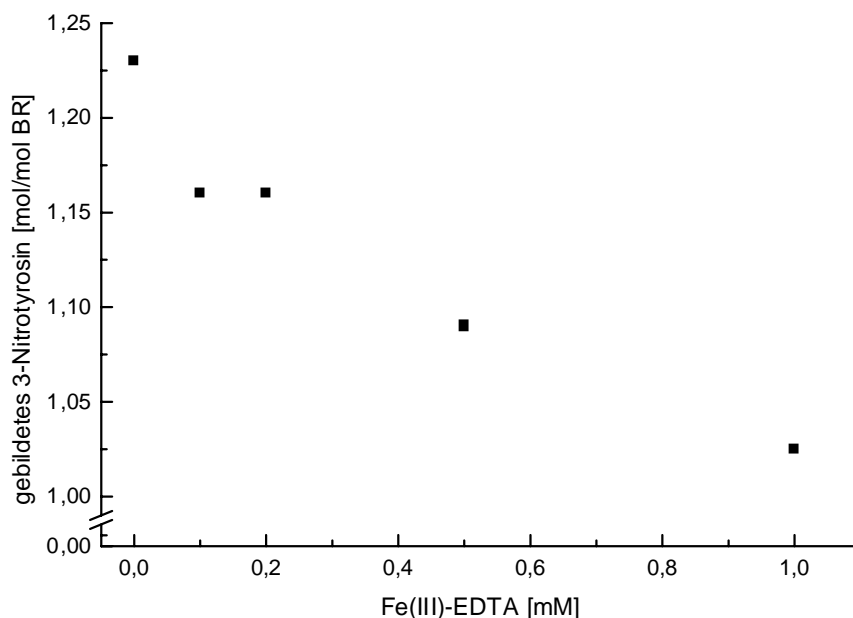


Abbildung 6.19: Bildung von 3-Nitrotyrosin durch Zugabe von ONOO^- zu PM-Suspension unter Variation der Fe(III)-EDTA-Konzentrationen (für weitere Angaben siehe Abbildung 6.18; Der NT/BR-Wert wurde aus den UV-VIS-Spektren (siehe Abschnitt 5.4.6) ermittelt.

Die in Abschnitt 6.8 gemachte Vermutung einer Korrelation zwischen der NT-Bildung und einer Verlangsamung der Photozykluskinetik kann durch Variation der Fe(III)-EDTA-Konzentration in den Reaktionsansätzen nicht bestätigt werden, da die geringen Änderungen des NT/BR-Wertes mit den eingesetzten Methoden nicht sicher zu detektieren sind. Auch die Geschwindigkeitskonstanten variieren nur geringfügig. Eine signifikante Zunahme der Nitrierungsreaktionen von Tyrosin durch PN infolge steigender Fe(III)-EDTA-Konzentrationen, wie sie an BSA beobachtet wurde (siehe Abbildung 6.9) und auch in der Literatur beschrieben ist (*Radi, 1999*), lässt sich an PM jedenfalls nicht beobachten. Es findet eher eine geringe Abnahme des NT/BR-Werts statt. Dies könnte darin begründet sein, dass der unter den Versuchsbedingungen negativ geladene Fe(III)-EDTA-Komplex von der ebenfalls negativ geladenen PM abgestoßen wird. Die aus der Wechselwirkung von PN mit Fe(III)-EDTA hervorgehende, nitrierende Spezies, würde somit eventuell nicht in direkter Nähe zum Protein entstehen und könnte anderweitig abreagieren. Diese Annahme ist jedoch lediglich eine Hypothese.

6.9 Reaktion von Peroxynitrit mit Purpurmembran / 2-Desoxyribose

Wie bereits erwähnt (siehe Abbildung 3.12), durchläuft ONOOH bei der Isomerisierung zu Nitrat eine Zwischenstufe ONOOH*, die partiell Eigenschaften des Hydroxylradikals (OH^\bullet) aufweist (evtl. als Folge einer teilweise auftretenden homolytischen Spaltung in OH^\bullet und NO_2^\bullet). Im folgenden wurden Experimente mit 2-Desoxyribose durchgeführt, da diese lediglich mit ONOOH* und nicht mit ONOO^- oder ONOOH reagiert (*Radi, 1996*). Diese Versuche sollten Hinweise liefern, welche der drei Peroxynitrit-Spezies (PN) für die Änderungen der Photozykluskinetik von BR in PM verantwortlich ist. Wenn trotz steigender 2-Desoxyribose-Konzentrationen der verlangsamende Einfluss von PN auf den Photozyklus nicht zurückgedrängt wird, ist dies ein klarer Hinweis auf ONOO^- oder ONOOH als reaktive Spezies. Im anderen Fall ist höchstwahrscheinlich ONOOH* das reaktive Agens.

Abbildung 6.20 zeigt, dass durch Kompetitionskinetik mit 2-Desoxyribose der Einfluss von PN auf den Photozyklus von BR in PM zurückgedrängt wird, was darauf hinweist, dass ONOOH* für die Änderungen der Photozykluskinetik verantwortlich ist. Man kann erkennen, dass die Photozykluskinetik von BR in PM, die nicht mit PN inkubiert wurde, vergleichsweise am schnellsten verläuft, während 5 mM ONOO^- in Abwesenheit von 2-Desoxyribose die Entstehung und den Zerfall des M-Intermediats am meisten verlangsamen. Bereits 0,1 M 2-Desoxyribose drängen den Einfluss von PN auf den Photozyklus zurück. Ein Effekt, der durch Anwesenheit von 0,3 M 2-Desoxyribose im Reaktionsansatz noch verstärkt wird, ohne jedoch die Geschwindigkeitskonstanten von BR in PM zu erreichen, die nicht mit PN inkubiert wurde.

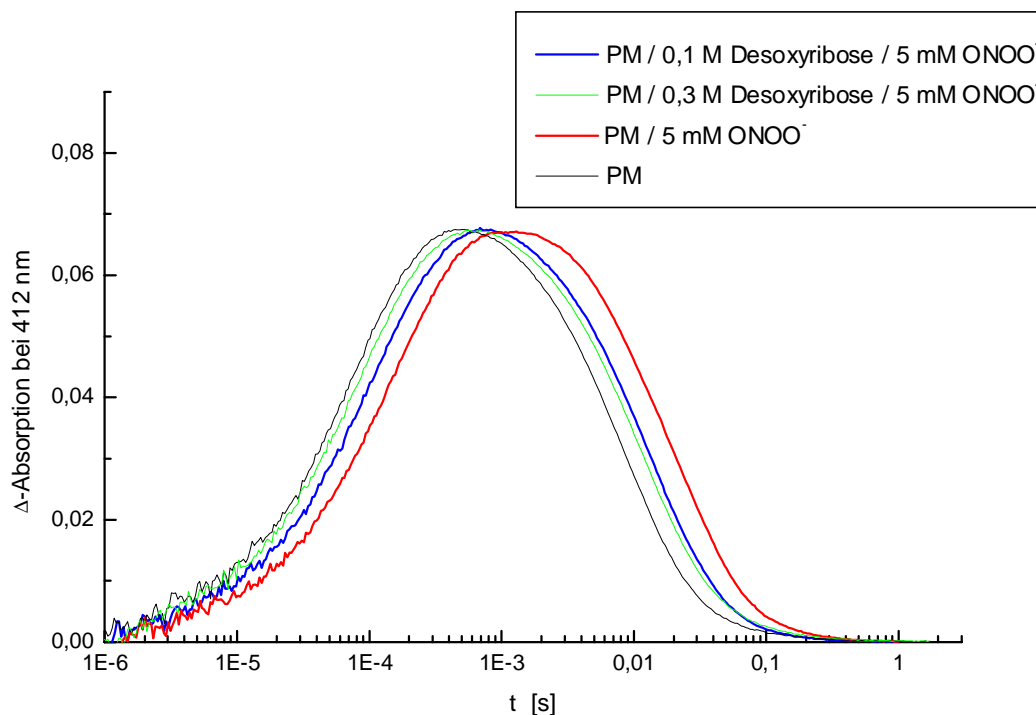


Abbildung 6.20: Einfluss von ONOO^- auf den Photozyklus von BR in PM unter variierender 2-Desoxyribose-Konzentration; PM (0,3 mg BR/ml) wurde mit 5 mM ONOO^- unter Variation der 2-Desoxyribose-Konzentration in 200 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) bei 37 °C inkubiert. Der pH-Wert erhöhte sich durch die Zugabe von PN auf 7,5. Nach 5 min wurde das Protein durch Gelpermeation mit 10 mM Phosphatpuffer (pH 6,0) als mobiler Phase (siehe Abschnitt 5.3.8) von dem oxidierenden Milieu getrennt. Mit den Eluaten wurden zeitabhängige Messungen der lichtinduzierten Bildung und des Zerfalls des M-Intermediats bei 20 °C durchgeführt. „PM“ wurde genauso wie die anderen Proben behandelt mit der Ausnahme, dass anstatt ONOO^- 10 mM NaOH zupipettiert wurde (ONOO^- -Stammlösung ist basisch). Die Amplituden sind normiert, um die Änderungen in der Kinetik besser zu veranschaulichen.

Abbildung 6.21 macht deutlich, dass ab 0,3 M eine weitere Erhöhung der 2-Desoxyribose-Konzentration ohne nennenswerten Einfluss auf die Kinetik des Photozyklus bleibt. Die Entstehungskonstanten des M-Intermediats entsprechen hierbei fast dem Wert der Referenz („PM“)¹. Die Zerfallskonstante der Referenz¹ ($k_{\text{Zerfall}} = 94 \text{ s}^{-1}$) wird jedoch deutlich verfehlt. Dies könnte damit zusammenhängen, dass als Reaktionsprodukt von 2-Desoxyribose mit OH^\bullet -Radikalen u.a. Malondialdehyd entsteht (siehe Abschnitt 5.4.4), das mit BR reagieren könnte. Somit ließe sich auch die verminderte Zerfallskonstante der Probe erklären, in der 5 mM ONOO^- mit 1 M 2-Desoxyribose/Phosphatpuffer inkubiert wurde und erst nach Isomerisierung zu Nitrat die Zugabe von PM („rev.Ord.“) erfolgte. Hier wurden $k_{\text{Zerfall}} = 79,4 \text{ s}^{-1}$

¹ nicht mit PN inkubiert

und $k_{\text{Entstehung}} = 1,11 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ gemessen. Die Konstanz der Zerfallskonstanten (bei Konzentrationen $\geq 0,3 \text{ M}$) trotz steigender Konzentrationen von 2-Desoxyribose noch vor Erreichen der Geschwindigkeitskonstanten der Referenz¹ könnte ebenfalls hierin begründet sein.

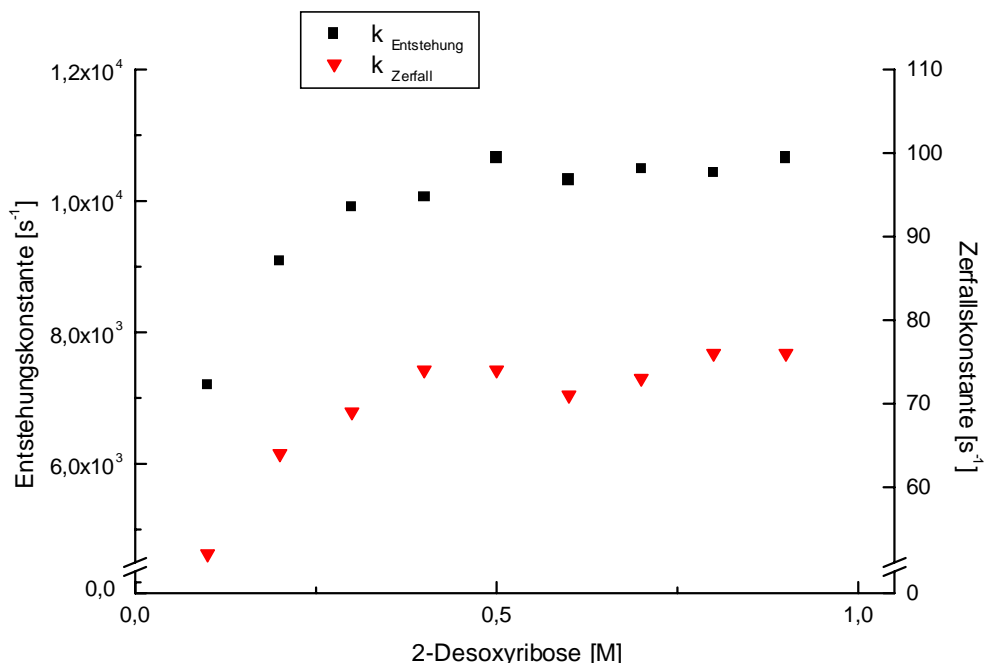


Abbildung 6.21: Einfluss von 5 mM ONOO^- bei Abwesenheit bzw. variierender 2-Desoxyribose-Konzentration auf die Geschwindigkeitskonstanten der Entstehung und des Zerfalls des M-Intermediats von PM; PM (0,3 mg BR/ml) in 200 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) wurde unter Anwesenheit der auf der Abzisse dargestellten 2-Desoxyribose-Konzentrationen mit 5 mM ONOO^- versetzt. Nach 5 min wurde das Protein durch Gelpermeation (siehe Abschnitt 5.3.8) von dem oxidierenden Milieu mit 10 mM Phosphatpuffer (pH 6,0) als mobiler Phase getrennt (siehe Abschnitt 5.3.8).

Abbildung 6.22 zeigt die UV-VIS-Spektren der PM-Suspensionen. Im Reaktionsansatz, bei dem PM mit 5 mM ONOO^- in Abwesenheit von 2-Desoxyribose inkubiert wurde („PM / 5 mM ONOO^- “), wurde am meisten 3-Nitrotyrosin (NT) gebildet, wie man anhand der Absorption im Bereich zwischen 250-500 nm erkennen kann. Wie bereits in Abschnitt 6.8 erwähnt, resultiert hieraus auch eine geringe Rotverschiebung der Retinalbande bei 570 nm. Die UV-VIS-Spektren der Proben, die unter variierender 2-Desoxyribose-Konzentration mit PN inkubiert wurden, weisen eine vergleichsweise geringere Bildung von NT auf. Untereinander weisen diese Proben zwischen 250-500 nm keinen signifikanten Unterschied auf. Die Retinalbande der Probe „PM / 0,1 M 2-Desoxyribose / 5 mM ONOO^- “ ist allerdings noch geringfügig rotverschoben. Bei dieser Konzentration an 2-Desoxyribose wird der

¹ nicht mit PN inkubiert

Einfluss von PN auf PM zwar offensichtlich schon zurückgedrängt (Vgl. mit „PM / 5 mM ONOO⁻“), aber noch nicht in dem Maße wie bei höheren 2-Desoxyribose-Konzentrationen (Vgl. mit „PM / 0,3 M 2-Desoxyribose / 5 mM ONOO⁻“). Dies steht in Einklang mit den in Abbildung 6.21 ermittelten Geschwindigkeitskonstanten.

Die Probe, in der PM erst nach Isomerisierung von ONOO⁻ zu Nitrat zugegeben wurde („rev.Ord.“)¹, ist unabsichtlich geringfügig höher konzentriert (Folge der Gelpermeation). Dies zeigt sich in der erhöhten Absorption bei 570 nm. Hieraus resultieren bei diesem Spektrum auch etwas höhere Absorptionen im Bereich zwischen 250-500 nm.

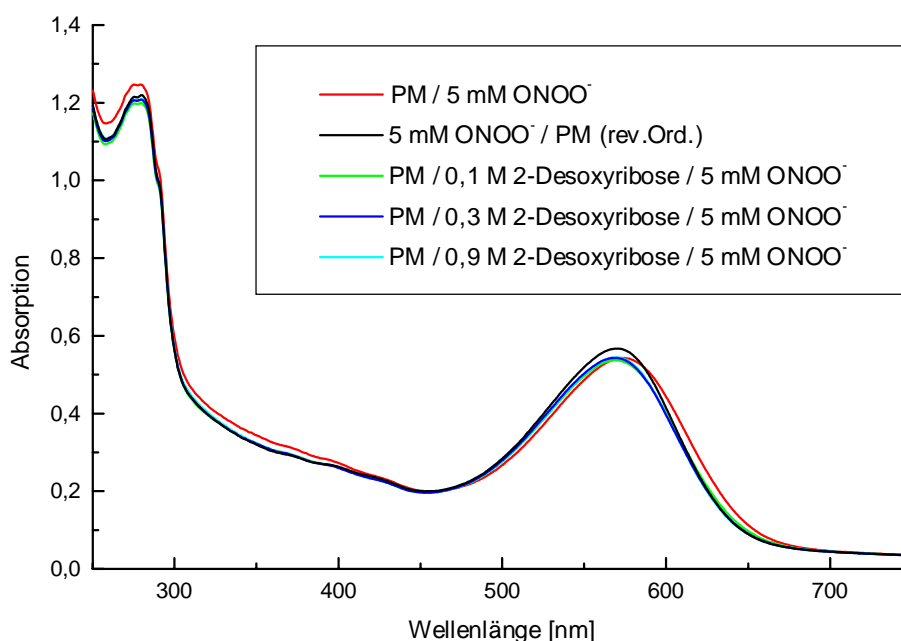
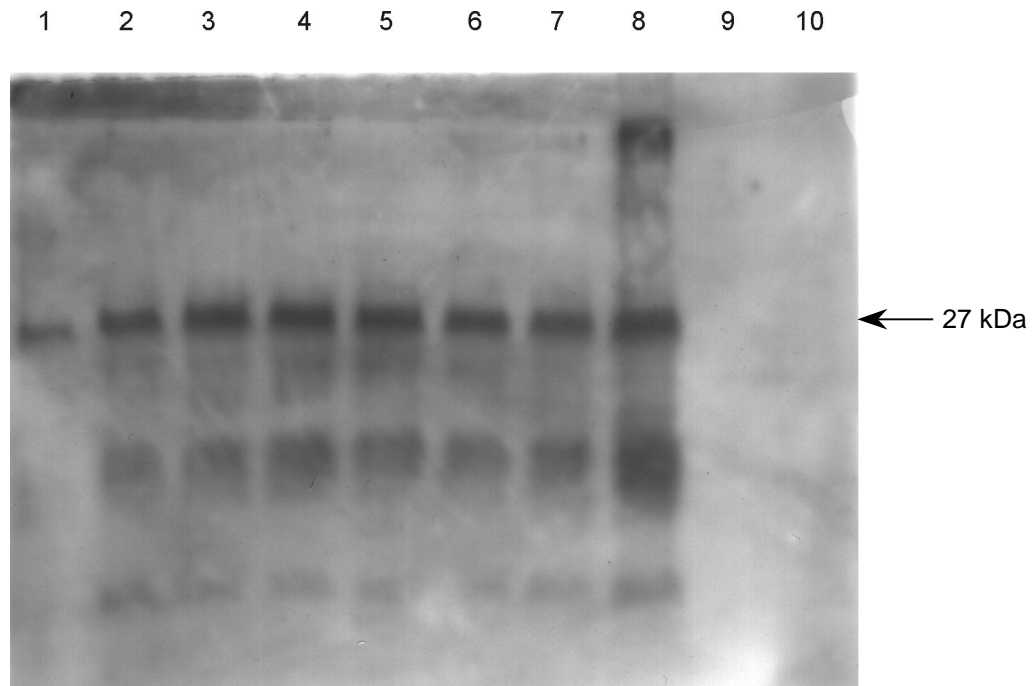


Abbildung 6.22: Einfluss von 5 mM ONOO⁻ bei Abwesenheit bzw. variierender 2-Desoxyribose-Konzentration auf das UV-VIS-Spektrum von PM; die UV-VIS-Spektren wurden von den in Abbildung 6.21 charakterisierten PM-Suspensionen in 10 mM Phosphatpuffer (pH 6,0) aufgenommen. „rev.Ord.“ bedeutet, dass ONOO⁻ erst mit Puffer und dann mit Proteinelösung versetzt wurde. Durch die Gelpermeation kann es zu unterschiedlich starken Verdünnungen kommen.

Um den NT-Gehalt zusätzlich zu untersuchen, wurde ein Western Blot zur Detektion von NT (siehe Abschnitt 5.4.10.3) durchgeführt (siehe Abbildung 6.23). In Spur 1 ist ein Pipettierfehler unterlaufen. Wenn man die Spuren 2-10 betrachtet, fallen mehrere Dinge auf. Spur 9 und 10, in denen ONOO⁻ erst in Puffer zu Nitrat isomerisierte, bevor PM zugegeben wurde, zeigen kein Signal und sprechen daher für die Spezifität der verwendeten Antikörper. Da in

¹ Die spektralen Eigenschaften dieser Probe sind identisch mit denen von PM, die nicht mit PN inkubiert wurde (siehe Abbildung 6.13).

allen Spuren die selbe Menge Protein (abgesehen von Spur 1) aufgetragen wurde, ist die Schwärzung proportional dem NT/BR-Verhältnis. Die intensivste Schwärzung kann man Spur



1. PM / 0,1 M 2-Desoxyribose / 5 mM ONOO⁻ (Pipettierfehler!)
2. PM / 0,2 M 2-Desoxyribose / 5 mM ONOO⁻
3. PM / 0,4 M 2-Desoxyribose / 5 mM ONOO⁻
4. PM / 0,5 M 2-Desoxyribose / 5 mM ONOO⁻
5. PM / 0,7 M 2-Desoxyribose / 5 mM ONOO⁻
6. PM / 0,8 M 2-Desoxyribose / 5 mM ONOO⁻
7. PM / 0,9 M 2-Desoxyribose / 5 mM ONOO⁻
8. PM / 5 mM ONOO⁻
9. 5 mM ONOO⁻ / PM (rev.Ord.)
10. 5 mM ONOO⁻ / 1 M 2-Desoxyribose / PM (rev.Ord.)

Abbildung 6.23: Western Blot zur Detektion von NT in BR in PM, die unter variierender 2-Desoxyribose-Konzentration mit 5 mM ONOO⁻ inkubiert wurde; die Details der Inkubation mit PN sowie die Abtrennung des Proteins aus dem oxidierenden Milieu sind Abbildung 6.21 zu entnehmen. Die PM-Suspensionen wurden im Verhältnis 1:1 mit *Probenpuffer* (siehe Abschnitt 5.4.2) versetzt, 4 min bei 100 °C inkubiert und dann auf ein SDS-Gel (C = 12 % T = 4 %) aufgetragen (~ 2 µg BR pro Spur). Der elektrophoretischen Wanderung im Gel und dem Transfer auf eine Membran aus Polyvinylidenfluorid folgte die Inkubation mit Antikörpern gegen NT und schließlich die Belichtung eines lichtsensitiven Filmes durch gebundenen Antikörper (siehe Abschnitt 5.4.10.3).

Die Identifizierung der 27 kDa-Bande, die BR entspricht, gelang durch den Vergleich mit dem Gel, das mit Coomassie-Blau (siehe Abbildung 6.24) gefärbt wurde.

8 zuordnen, in der PM in Abwesenheit von 2-Desoxyribose mit PN inkubiert wurde. Die anderen PM-Proben zeigen geringere untereinander aber ungefähr gleiche Intensitäten, was gut mit den Photozykluskinetiken in Abbildung 6.21 korreliert und die UV-VIS-Spektren (siehe

Abbildung 6.22) bestätigt. Dennoch ist es verwunderlich, dass selbst bei einer 0,9 M 2-Desoxyribose-Konzentration scheinbar immer noch NT gebildet wird. Diese Konzentration ist verglichen mit der Konzentration an Tyrosin ($\sim 0,1$ mM) sehr groß. Wie bereits erwähnt, ist die Reaktionsgeschwindigkeit von Tyrosin mit Peroxynitrit auch nicht besonders hoch, so dass unter dem Blickwinkel einer Konkurrenzreaktion hohe 2-Desoxyribose-Konzentrationen die Bildung von NT eigentlich unterdrücken sollten. Dass trotzdem NT gebildet wird, ist eine weitere Erklärung für die immer noch verminderten Geschwindigkeitskonstanten der Entstehung und des Zerfalls des M-Intermediats von PM, die in Gegenwart hoher Konzentrationen an 2-Desoxyribose mit ONOO^- inkubiert wurde. Der Western Blot zeigt in den Spuren 2-7 überraschenderweise zwei weitere Signale (in Spur 8 ist noch eine dritte Bande beim Übergang vom Sammel- ins Trenngel erkennbar), die auf Proteine mit geringeren Molekulargewicht hinweisen. Dies ist wahrscheinlich nicht auf den Einfluss von PN zurückzuführen, da es nicht reproduzierbar in den Western Blots auftritt (siehe Abbildung 6.45, Seite 170). Auch aus dem mit Coomassie-Blau gefärbten SDS-Gel (siehe Abbildung 6.24) ist kein Anzeichen auf Bildung dieser Banden als Folge der Inkubationsbedingungen erkennbar. Mit der Silberfärbung (siehe Abbildung 6.44, Seite 169), die eine geringere Nachweisgrenze besitzt, konnte ebenfalls kein Hinweis auf den teilweisen Abbau bzw. die Bildung von Oligomeren oder nicht löslicher BR-Aggregate als Folge der Inkubation von PM mit PN erhalten werden. Da auch das mit Coomassie-Blau gefärbte Gel eine ungewöhnliche Doppelbande zeigt, liegt hier eher ein Charakteristikum der eingesetzten PM-Fraktion vor. Beispielsweise könnte eine partielle Hydrolyse des Carboxyterminus vorliegen. Eine andere Möglichkeit wäre, dass ein Großteil der BR-Moleküle noch nicht vollständig prozessiert ist. So konnten Wölfer *et al.* (1988) in PM-Präparationen BR mit einem um 13 Aminosäuren verlängerten Aminoterminal nachweisen.

Obwohl die Interpretation des Bandenmuster im Western Blot nicht möglich war, spiegelt die Intensität der Signale die gemessene Bildung von NT aus den UV-VIS-Spektren (siehe Abbildung 6.22) wider.

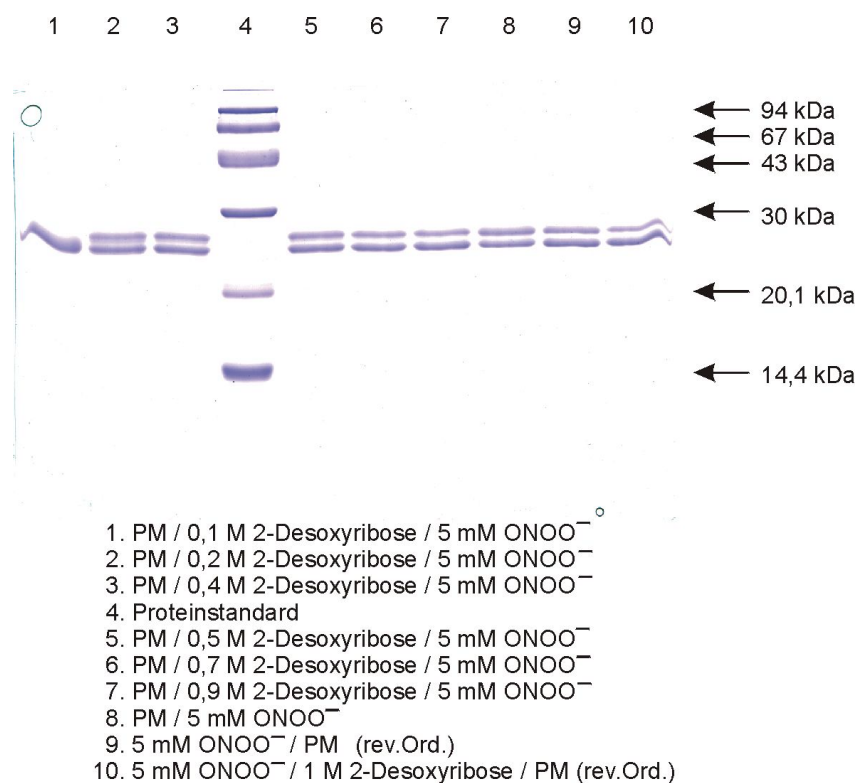


Abbildung 6.24: Färbung der Proteinbanden mit Coomassie-Blau; PM wurde in Gegenwart variierender Konzentrationen von 2-Desoxyribose mit ONOO⁻ inkubiert. Für Details siehe Abbildung 6.21 und 6.23). Nach der SDS-PAGE wurde eine Färbung mit Coomassie-Blau durchgeführt (siehe Abschnitt 5.4.3.1).

6.10 Einfluss von Hydroxylradikalen auf Proteine

Wie in Abschnitt 6.9 gezeigt werden konnte, ist ONOOH* scheinbar für die Modifizierungen an PM durch PN verantwortlich. Die genaue Natur dieser Spezies ist noch nicht sicher geklärt. Sie weist jedoch teilweise ähnliche Eigenschaften auf wie das Hydroxylradikal. Um zu untersuchen, ob sich die Effekte an PM, die bei Inkubation mit PN auftreten, mit Hydroxylradikalen wiederholen lassen, wurden nach zwei verschiedenen Methoden Hydroxylradikale generiert. Die Produktanalyse bei der Metall-katalysierten Oxidation von Proteinen durch das System Cu²⁺/H₂O₂ lässt auf das Entstehen von OH• zurückschließen (*Huggins et al., 1993*), obwohl im Gegensatz zu der in Abbildung 3.6 (Seite 17) gezeigten *Fenton-Reaktion* das Übergangsmetall-Kation nicht in der reduzierten Form eingesetzt wird. Als zweite Methode zur Generierung von OH•-Radikalen wurde die Photolyse von N-Hydroxy-2-thiopyridon eingesetzt, eine Methode, die nicht auf die Anwesenheit von Übergangsmetall-Kationen angewiesen ist.

6.10.1 Metall-katalysierte Oxidation von Proteinen

Bei der Metall-katalysierten Oxidation von BSA durch das System $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ identifizierten *Leeuwenburgh et al., 1997a* neben weiteren Modifikationen *o*-Tyrosin als Hauptprodukt. Die in Abbildung 6.25 gezeigten UV-Spektren von BSA, das mit dem System $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ inkubiert wurde, weisen eine geringe Zunahme der Absorption im Bereich zwischen 250-350 nm

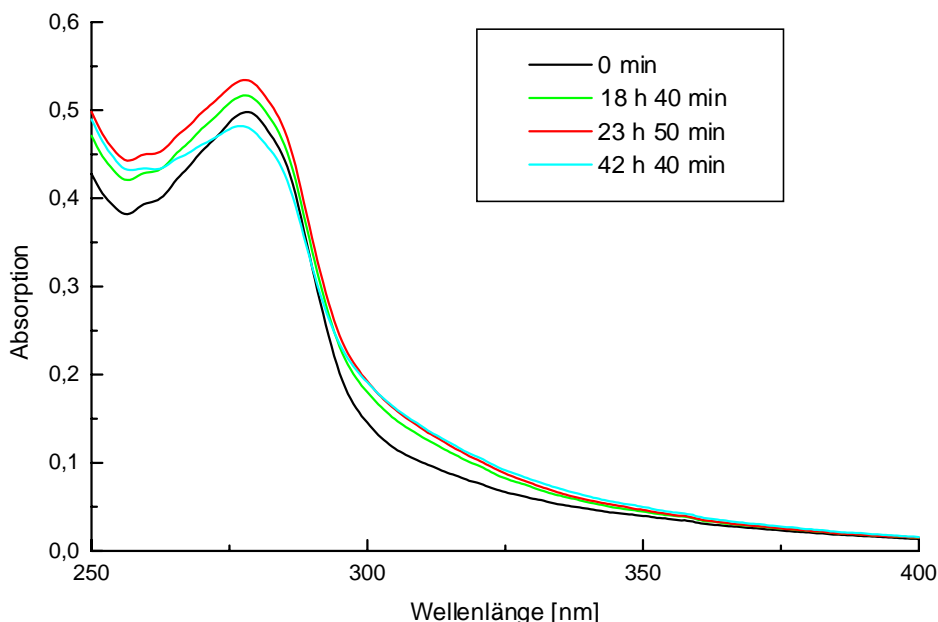
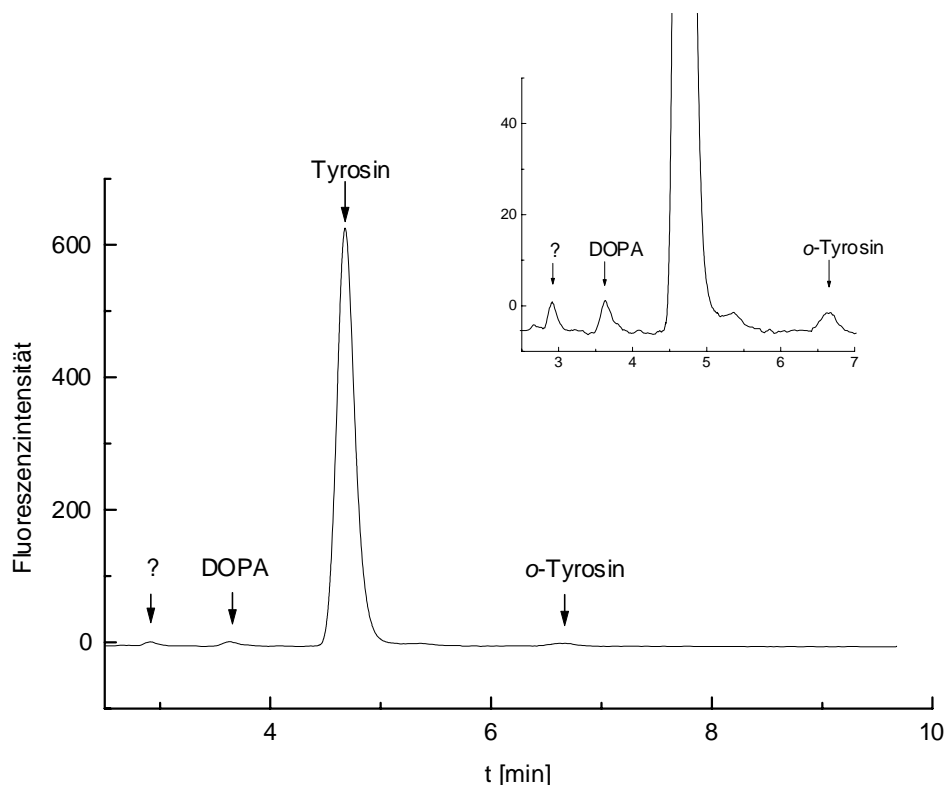


Abbildung 6.25: Einfluss von $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ auf das UV-Spektrum von BSA; BSA (1 mg/ml) wurde bei 37 °C mit CuSO_4 (10 μM) und H_2O_2 (10 mM) inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten wurde 1 ml der Reaktionslösung auf eine Sephadex® G 25-Säule gegeben, mit *aqua bidest.* eluiert und das UV-Spektrum aufgenommen. Durch die Chromatographie kann es zu unterschiedlich starken Verdünnungen kommen.

auf. Dieses Ergebnis erlaubt den Rückschluss, dass aromatische Aminosäurereste modifiziert wurden. Die saure Hydrolyse der BSA-Probe und anschließende RP-HPLC mit UV-Detektion (siehe Abschnitt 5.4.9.4) zeigten aber lediglich das Tyrosin-Signal. Erst durch Einsatz eines Fluoreszenz-Detektors mit $\lambda_{\text{Ex}} = 280 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{Em}} = 320 \text{ nm}$ konnten neben dem Tyrosin-Signal geringe Mengen an *o*-Tyrosin und 3,4-Dihydroxyphenylalanin nachgewiesen werden (siehe Abbildung 6.26). Dityrosin fluoresziert bei diesen Wellenlängen nicht (*Malencik et al., 1996*).



Säule: HPLC-Säule Nucleosil (Säulenmaterial 20-5 C18)

Proben: Hydrolysat von BSA, das 42 h 40 min mit $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ inkubiert wurde (siehe Abbildung 6.25)

Probenschleifenvolumen: 160 μl

Flussgeschwindigkeit: 1,5 ml/min

Detektion: Fluoreszenz bei $\lambda_{\text{Ex}} = 280 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{Em}} = 320 \text{ nm}$

Mobile Phase: 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ (pH 3,0); 3 % (v/v) Methanol

Abbildung 6.26: Chromatogramm eines Hydrolysates von BSA, das zuvor mit $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ inkubiert wurde; die Bedingungen sind Abbildung 6.25 zu entnehmen. BSA wurde in 6 M HCl hydrolysiert (siehe Abschnitt 5.4.8), das Hydrolysat mit RP-HPLC aufgetrennt (siehe Abschnitt 5.4.9.4) und aromatische Aminosäuren mit einem Fluoreszenzdetektor nachgewiesen. Es wurden neben Tyrosin geringe Mengen an 3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA) und *o*-Tyrosin im Hydrolysat gefunden. Ein weiteres Signal (Retentionszeit 3 min) konnte nicht identifiziert werden. Die Identifikation der Aminosäuren fand durch den Vergleich mit den Retentionszeiten von Standardproben statt (siehe Abschnitt 6.4.2). Der Einschub ist eine Ausschnittsvergrößerung, um die kleinen Signale besser sichtbar zu machen.

Eine Quantifizierung der modifizierten Aminosäuren wurde nicht durchgeführt. Letztlich konnte jedoch sowohl durch die UV-Spektren (siehe Abbildung 6.25) als auch durch die RP-HPLC mit Fluoreszenzdetektion (siehe Abbildung 6.26) nachgewiesen werden, dass nur im geringen Umfang Modifikationen an den aromatischen Aminosäureresten von BSA stattfanden. Für die Versuche mit Purpurmembran wurde die Kupferkonzentration des Reaktionsansatzes daher auf 0,1 mM (bei den Versuchen mit BSA betrug $[\text{Cu}^{2+}] = 10 \mu\text{M}$) erhöht. In Abbildung 6.27 ist der Einfluss von $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ auf die UV-VIS-Spektren von PM dargestellt.

Im UV-Bereich und in der Chromophorbande des Retinals sind Absorptionsabnahmen zu erkennen. Bei ca. 480 nm ist hingegen eine leichte Zunahme der Absorption festzustellen.

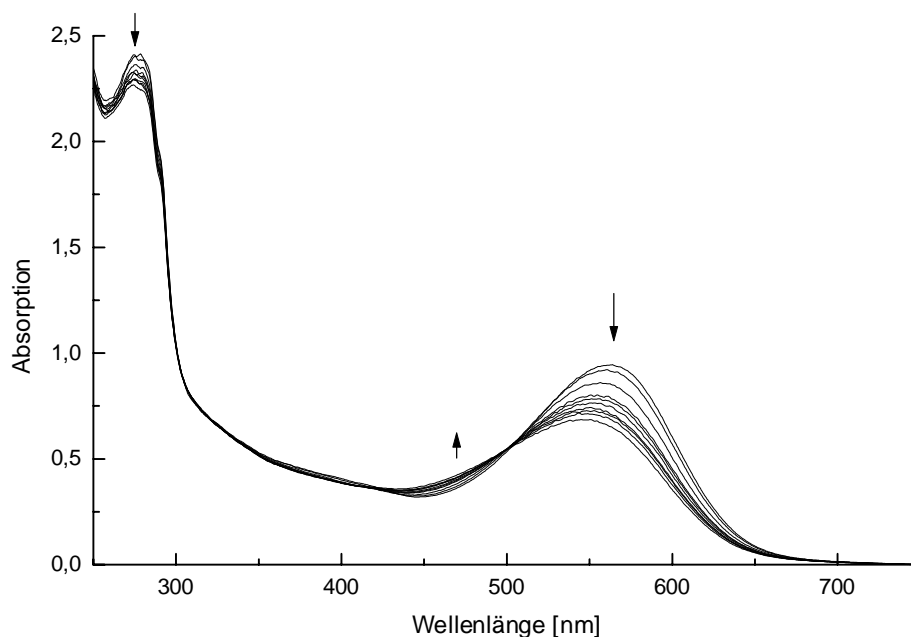


Abbildung 6.27: Einfluss von $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ auf das UV-VIS-Spektrum von PM; PM (0,4 mg BR/ml) in 100 mM Phosphatpuffer (pH 9,0) wurde bei 37 °C mit Cu^{2+} (0,1 mM) und H_2O_2 (10 mM) im Dunkeln inkubiert. Die Cu^{2+} -Konzentration war zehnmal höher als bei den entsprechenden Versuchen mit BSA (siehe Abbildung 6.25). Zu verschiedenen Zeiten (0 min, 10 min, 30 min, 60 min, 75 min, 90 min, 110 min, 120 min, 135 min und 180 min) wurden UV-VIS-Spektren aufgenommen. Die Pfeile zeigen die Richtung der zeitabhängigen Veränderungen an.

Die vergleichende Betrachtung von Abbildung 6.27 mit 6.28 zeigt, dass die Absorptionszunahme bei ca. 480 nm wieder auf Effekte zurückzuführen ist, die im Zusammenhang mit der alkalischen Blauverschiebung der Chromophorbande stehen (siehe Abschnitt 3.2.1). Sie ist daher bei pH 7,4 nicht zu beobachten (siehe Abbildung 6.28). Das Ausmaß der Abnahme der Chromophorbande lässt sich jedoch durch die Blauverschiebung nicht erklären. Vielmehr wird Retinal offenbar durch die Metall-katalysierte Oxidation angegriffen, so dass die spektralen Eigenschaften des Doppelbindungssystems verlorengehen. Wenn Bacteriorhodopsin (BR) unter den oxidativen Bedingungen lediglich denaturieren würde (unter Erhalt der chemischen Struktur von Retinal), müsste ein Signal bei ca. 380 nm für „freies“ Retinal erkennbar sein. Modifikationen an den Aminosäureresten, welche die chemische Umgebung von Retinal bilden, sind jedoch als Ursache für die beobachteten spektralen Änderungen auch nicht auszuschließen.

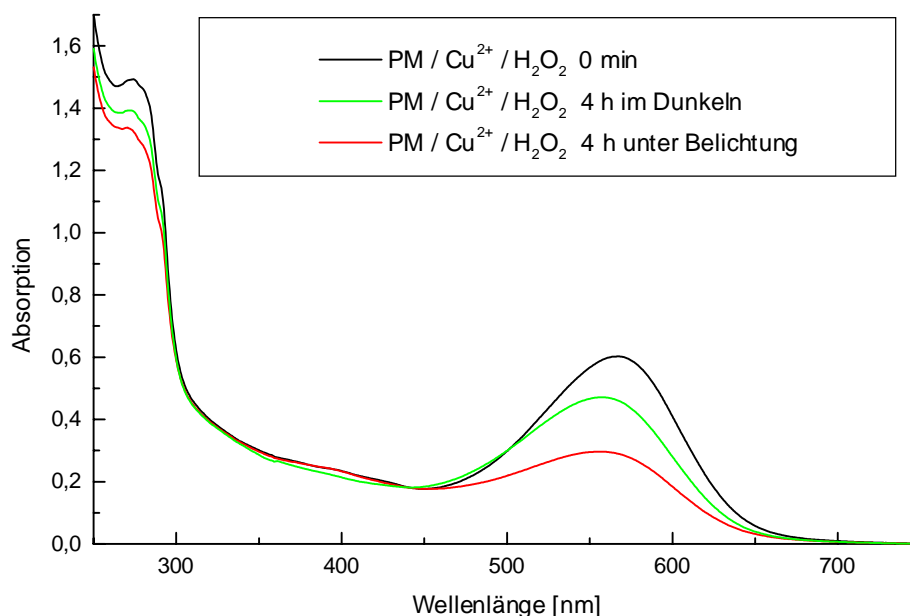


Abbildung 6.28: Einfluss von Licht auf die Cu²⁺/H₂O₂-abhängigen Änderungen im UV-VIS-Spektrum von PM; PM (0,3 mg BR/ml) in 50 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) wurde mit Cu²⁺ (0,1 mM) und H₂O₂ (10 mM) bei 37 °C im Dunkeln bzw. mit dem Licht einer Weißlichtlampe mit einer Intensität von 1600 mW/cm² bestrahlt. Zu Beginn der Reaktion sowie nach je 4 h wurde ein UV-VIS-Spektrum aufgenommen.

Neben den Änderungen im Bereich von 570 nm ist im UV-VIS-Spektrum auch eine geringe Abnahme der Absorption bei 280 nm zu beobachten. Hieraus kann man folgern, dass Reaktionen mit aromatischen Aminosäuren stattfanden. Die Abnahme ließe sich z.B. durch Reaktion mit Tryptophanresten unter Verlust der Aromatizität erklären. Die Bildung bekannter Modifikationen, wie z.B. Dityrosin oder *o*-Tyrosin, würde dagegen zu einer Erhöhung der Absorption in diesem Bereich führen.

In Abbildung 6.28 fällt noch auf, dass die Bestrahlung der Probe die Absorptionsabnahme bei 570 nm verstärkt. Dies lässt sich damit erklären, dass BR durch Lichtanregung den Photozyklus durchläuft. Die hierbei stattfindenden Konformationsänderungen können die Zugänglichkeit von Retinal bzw. von Aminosäuren in seiner Umgebung begünstigen. Ohne Cu²⁺/H₂O₂ bleibt das Licht ohne jeden Einfluss auf PM.

Die in Abbildung 6.29 wiedergegebenen Ergebnisse zeigen eine Beschleunigung der Entstehungs- und eine Abnahme der Zerfallskinetik des M-Intermediats um jeweils ca. den Faktor vier. Somit ist klar, dass neben den (vermuteten) Reaktionen mit Retinal auch Änderungen am Protein stattgefunden haben müssen, welche die Kinetik beeinflussen.

Die Zeitkonstanten der M-Intermediatkinetik von PM, die nicht mit $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ inkubiert wurde, betragen $\tau_{\text{Entstehung}} = 89 \mu\text{s}$ und $\tau_{\text{Zerfall}} = 10 \text{ ms}$. PM, die 3 h im Dunkeln mit $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ inkubiert wurde, besitzt dagegen Zeitkonstanten von $\tau_{\text{Entstehung}} = 21 \mu\text{s}$ und $\tau_{\text{Zerfall}} = 36 \text{ ms}$.

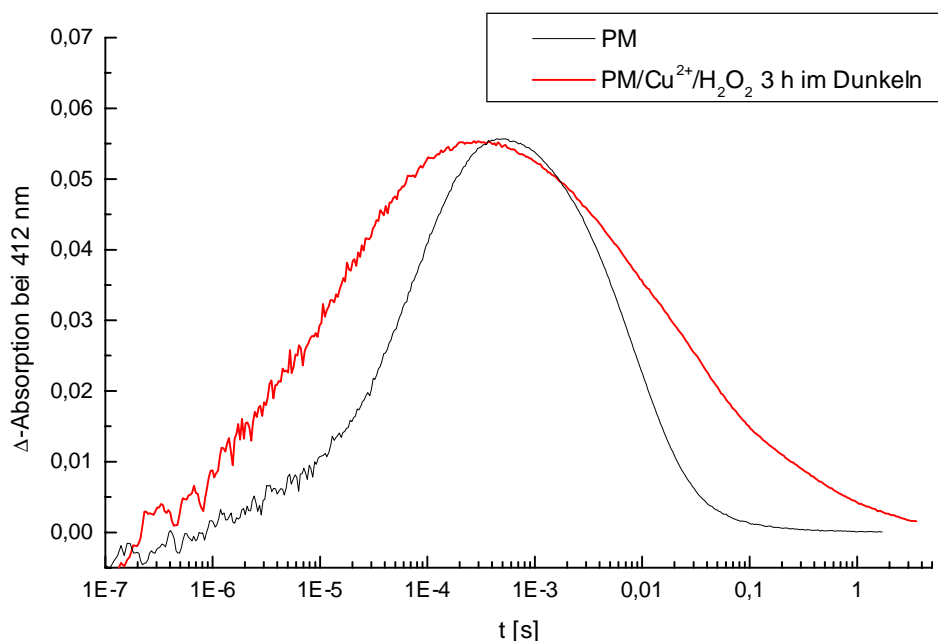


Abbildung 6.29: Einfluss von $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ auf den Photozyklus von BR in PM; die Bedingungen sind Abbildung 6.27 zu entnehmen. Die Messung der M-Intermediatkinetik fand bei 20 °C statt. Die Amplituden sind normiert, um die Änderungen in der Kinetik besser zu veranschaulichen.

Der Vergleich dieser Daten mit den Ergebnissen aus den Versuchen mit Peroxynitrit zeigt, dass BR in PM gegenüber der Metall-katalysierten Oxidation sehr viel sensibler ist. Die M-Intermediatkinetik wird stärker beeinflusst und Retinal, das die Inkubation mit Peroxynitrit unbeschadet übersteht, wird ebenfalls angegriffen. Eine Beurteilung, ob dies auf die ortsspezifischen Reaktionen¹ durch die Metallkatalyse zurückzuführen ist, lässt sich mit den vorhandenen Daten nicht treffen. Die Versuche mit dem von Übergangsmetall-Kationen unabhängigen OH^\bullet -Generator N-Hydroxy-2-thiopyridon (siehe Abschnitt 6.10.2) zeigen jedenfalls sehr viel geringere Änderungen.

¹ Man spricht bei Metall-katalysierten Oxidationen von ortsspezifischen Reaktionen, da die Hydroxylradikale in unmittelbarer Nähe ihres Entstehungsortes abreagieren. Dabei handelt es sich meistens um den Teil des Proteins, der das Übergangsmetall-Kation komplexiert.

6.10.2 Einfluss von N-Hydroxy-2-thiopyridon auf Purpurmembran

In Abbildung 6.30 sind die UV-VIS-Spektren von Purpurmembransuspensionen gezeigt, die verschieden lang in Anwesenheit von N-Hydroxy-2-thiopyridon belichtet wurden. Im Gegensatz zu dem $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ -System (siehe Abbildung 6.27) sind im Bereich der Retinalbande keinerlei Änderungen erkennbar. In dem UV-Bereich, in dem bei der Metall-katalysierten Oxidation (MCO) eine Abnahme der Absorption zu beobachten ist, nimmt die Absorption nun zu.

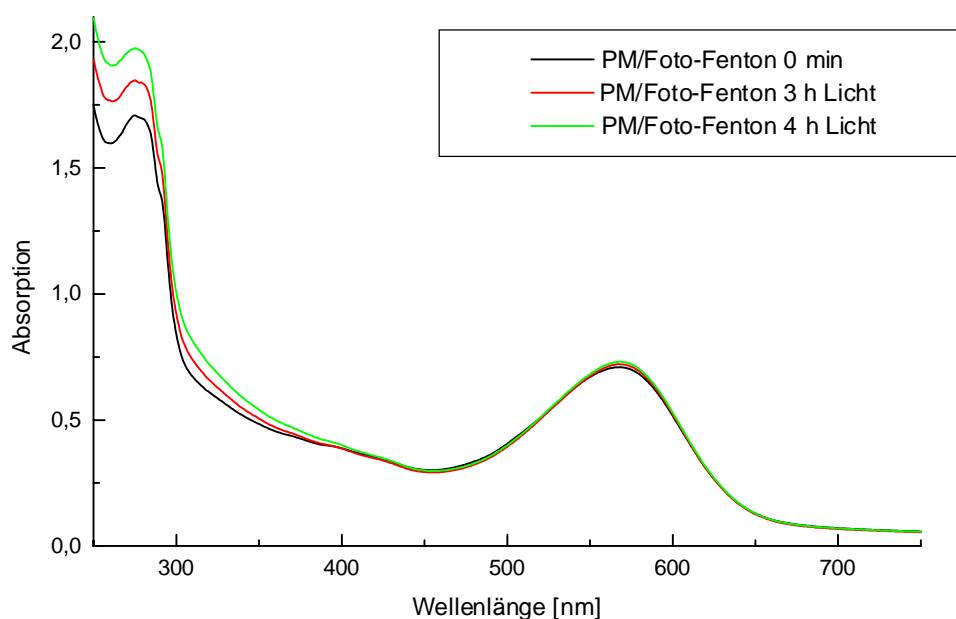


Abbildung 6.30: Einfluss von Hydroxylradikalen auf das UV-VIS-Spektrum von PM; PM-Suspension (0,3 mg BR/ml) in 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) wurde nach Zugabe von N-Hydroxy-2-thiopyridon-Lösung (0,1 mM) mit einer Weißlichtlampe (1600 mW/cm^2) bestrahlt. Zu bestimmten Zeiten wurde 1 ml des Reaktionsansatzes auf eine Sephadex® G 25-Säule aufgetragen, mit 10 mM Phosphatpuffer (pH 6,0) eluiert und das UV-VIS-Spektrum aufgenommen.

Die Zeitkonstanten der M-Intermediatkinetik von BR zum Zeitpunkt $t = 0 \text{ min}$ betragen $\tau_{\text{Entstehung}} = 96 \text{ }\mu\text{s}$ und $\tau_{\text{Zerfall}} = 5,4 \text{ ms}$. BR, das 4 h in Gegenwart von N-Hydroxy-2-thiopyridon belichtet wurde, besitzt Zeitkonstanten für die Entstehung und den Zerfall des M-Intermediats von $\tau_{\text{Entstehung}} = 94 \text{ }\mu\text{s}$ und $\tau_{\text{Zerfall}} = 7,2 \text{ ms}$. Die Bildungskinetik bleibt also unbeeinflusst. Die Zerfallskinetik dagegen verlangsamt sich geringfügig durch den Einfluss von N-Hydroxy-2-thiopyridon. Verglichen mit der Änderung durch die MCO ist die Zerfallskinetik aber nahezu unverändert.

Dass durch Belichtung von N-Hydroxy-2-thiopyridon tatsächlich Hydroxylradikale gebildet wurden, konnte mit dem Desoxyribose-Test gezeigt werden (siehe Abschnitt 5.4.4).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die MCO unter den vorgegebenen Bedingungen sowohl die Retinalbande als auch die Photozykluskinetik stärker beeinflusst als N-Hydroxy-2-thiopyridon bzw. Peroxynitrit. Die Änderungen im UV-Bereich sind hingegen bei der MCO geringer (die Absorptionen nehmen sogar geringfügig ab). Parallelen zu den Beobachtungen an PM, die mit Peroxynitrit inkubiert wurde (siehe Abschnitt 6.8), konnten nicht gefunden werden.

6.11 Reaktionen von Peroxynitrit in Gegenwart von Kohlendioxid

Der Einfluss von Kohlendioxid (CO₂) auf die Reaktion von Peroxynitrit mit Proteinen wurde untersucht. Durch Bildung des Nitrosoperoxocarbonylat-Anions finden bevorzugt Nitrierungsreaktionen statt (siehe Abschnitt 3.1.1.2). *Zhang et al. (2001)* fanden jedoch, dass dies nicht für die Membranphase gilt. Die Nitrierung von Tyrosinresten in der Lipidphase scheint nicht, von der CO₂-Konzentration abhängig zu sein.

In Anwesenheit von CO₂ wird auch die Isomerisierung zu Nitrat katalysiert. Daher sind Carbonatpuffer zur Lagerung von ONOO⁻-Lösungen ungeeignet. Die Geschwindigkeitskonstante für die Bildung des Nitrosoperoxocarbonylat-Anions aus CO₂ und ONOO⁻ beträgt $k = 5,8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bei 37 °C. Beim Menschen beträgt die intra- und extrazelluläre CO₂-Konzentration 1-2 mM und dürfte somit *in vivo* das Verhalten von Peroxynitrit entscheidend beeinflussen. Da CO₂ in wässriger Lösung im Gleichgewicht mit Hydrogencarbonat (HCO₃⁻) liegt (siehe Abbildung 6.31), kann man über die HCO₃⁻-Konzentration die CO₂-Konzentration einstellen.

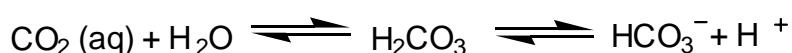


Abbildung 6.31: Kohlendioxid (CO₂) liegt über Kohlensäure (H₂CO₃) mit Hydrogencarbonat (HCO₃⁻) im Gleichgewicht

Nach *Radi et al. (1999)* beträgt bei pH 7,4 und 37 °C das Verhältnis HCO₃⁻/CO₂ (aq) ~ 20 ($7,94 \times 10^{-7} \text{ M} / [\text{H}^+] = [\text{HCO}_3^-]/[\text{CO}_2]$). Damit sich die Gleichgewichte ausbilden können, wurden die Reaktionsansätze 5 min vor ONOO⁻-Zugabe bei 37 °C inkubiert.

Auch wenn in den Reaktionsansätzen definierte Mengen HCO₃⁻ zugegeben wurden, wird im folgenden stets die sich daraus resultierende CO₂-Konzentration angegeben.

6.11.1 Reaktion von Peroxynitrit mit BSA in Gegenwart von Kohlendioxid

Wie man Abbildung 6.32 und Abbildung 6.33 entnehmen kann, führt die Anwesenheit von geringen CO_2 -Konzentrationen ($< 0,2 \text{ mM}$) tatsächlich zur vermehrten Bildung von NT in BSA, wenn man dieses mit Peroxynitrit (PN) inkubiert. Steigert man die CO_2 -Konzentration in den Bereich, der in etwa dem *in vivo*-Gehalt beim Menschen entspricht ($1,3 \text{ mM}$), nimmt der Anteil der Nitrierungsreaktionen wieder ab und ist ungefähr auf dem gleichen Niveau oder vielleicht sogar geringer als bei Abwesenheit von CO_2 . Die maximale Nitrierung bei ca. $0,2 \text{ mM}$ CO_2 ist sowohl in den Ergebnissen der RP-HPLC mit UV-Detektion als auch aus den UV-VIS-Spektren erkennbar.

Die Abnahme der Nitrierungsreaktionen bei CO_2 -Konzentrationen $> 0,2 \text{ mM}$ lässt sich damit erklären, dass CO_2 die Isomerisierung von Peroxynitrit zu Nitrat katalysiert. *Radi et al. (1999)* fanden einen linearen Zusammenhang zwischen der CO_2 -Konzentration und der Zerfallskonstante von ONOO^- in 100 mM Phosphatpuffer ($\text{pH } 7,4$).

Bei der mehrfach beobachteten Zunahme der Nitrierung an Phenol(-derivaten) in Abhängigkeit von der CO_2 -Konzentration, deren graphische Auftragung kein Maximum sondern eher einen hyperbolischen Verlauf aufweist (*Radi et al., 1999; Lemercier et al., 1997; Uppu et al., 1996*), muss man berücksichtigen, dass diese Substrate gut „zugänglich“ waren. In Proteinen hingegen sind Aminosäuren abhängig von der jeweiligen Proteinstruktur unterschiedlich stark zur wässrigen Phase exponiert. Wenn das gebildete Nitrosoperoxocarbonat-Anion erst zum Reaktionsort diffundieren muss, kann CO_2 zu einer Erniedrigung des Nitrierungsgrades führen. Die durch CO_2 auch katalysierte Isomerisierung zu Nitrat kann dann dazu führen, dass sich Peroxynitrit vor Erreichen des Reaktionsortes bereits zu Nitrat umgewandelt hat. Sterische Aspekte könnten ebenfalls eine Rolle spielen, da das Nitrosoperoxocarbonat-Anion größer ist als Peroxynitrit.

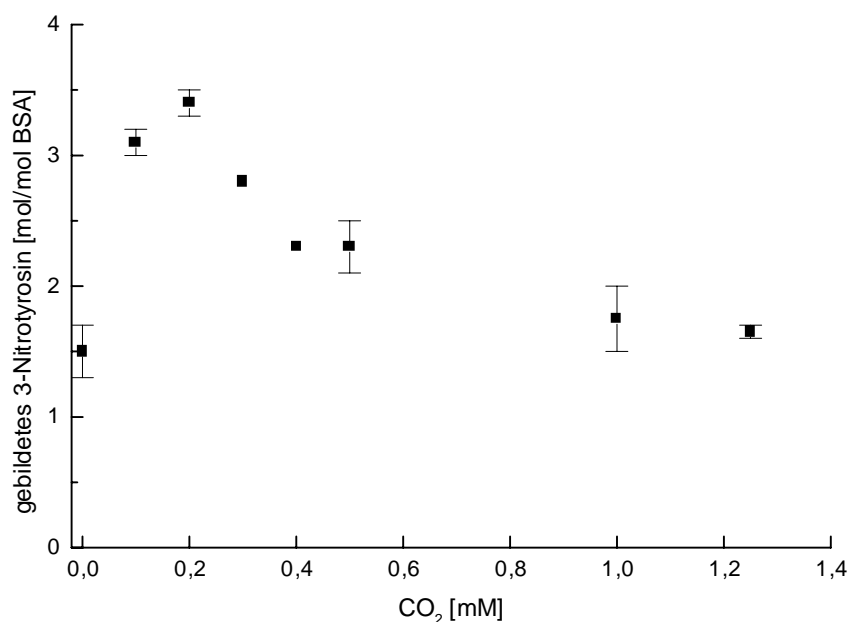


Abbildung 6.32: Bildung von 3-Nitrotyrosin durch Zugabe von 0,5 mM ONOO⁻ zu BSA-Lösungen (1 mg/ml) in 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) unter Variation der CO₂-Konzentration; der pH-Wert erhöhte sich durch die Zugabe von Peroxynitrit auf 7,5. Nach 5 min wurde das Protein durch Gelpermeation von dem oxidierenden Milieu getrennt (siehe Abschnitt 5.3.8). Als Eluens wurde hierbei *aqua bidest.* eingesetzt. Der pH-Wert der aufgefängenen Fraktionen wurde durch Zugabe von NaOH auf ca. 10,5 erhöht, bevor die UV-VIS-Messung durchgeführt und der NT/BSA-Wert bestimmt wurde (siehe Abschnitt 5.4.6).

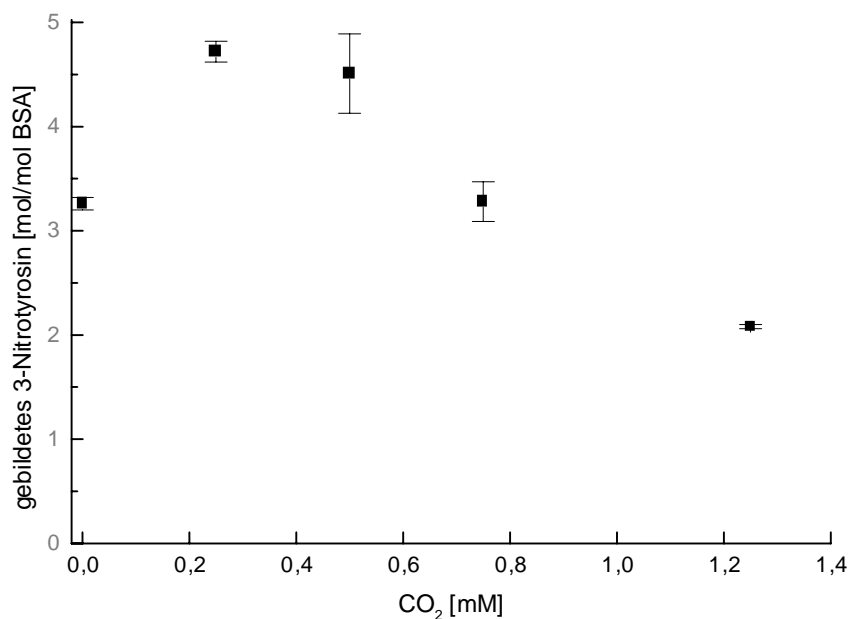


Abbildung 6.33: Bildung von 3-Nitrotyrosin durch Zugabe von ONOO⁻ zu BSA-Lösungen unter Variation der CO₂-Konzentration (Bedingungen sind analog Abbildung 6.32); die Proteinlösungen wurden einer sauren Hydrolyse unterzogen (siehe Abschnitt 5.4.8) und der NT/BSA-Wert durch RP-HPLC mit UV-Detektion (siehe Abschnitt 5.4.9.4 und Anhang 8B) bestimmt. Die Ordinatenwerte sind grau unterlegt, da die absoluten Zahlen ungefähr um den Faktor 2 von den aus den UV-VIS-Spektren ermittelten Werten (siehe Abbildung 6.32) abweichen.

Die in der Arbeit an BSA erhaltenen Daten stehen jedoch auch im Widerspruch zu *Gow et al. (1996)*, die ebenfalls an BSA die Bildung von NT durch PN (4 mg/ml BSA; 2 mM ONOO⁻) bei variierendem CO₂-Gehalt gemessen haben. Maximale Bildung von NT (allerdings bei pH 7,6) fanden diese bei 10 mM HCO₃⁻ (3 0,3 mM CO₂)¹, was noch in relativ guter Übereinstimmung mit den in Abbildung 6.32 dargestellten eigenen Ergebnissen ist. *Gow et al. (1996)* detektierten jedoch bei einer Erhöhung auf 25 mM (3 0,8 mM CO₂)¹ bzw. 50 mM HCO₃⁻ (3 1,6 mM CO₂)¹ unverändert hohe NT-Mengen, während die eigenen Ergebnisse ein Absinken des NT-Wertes auf ein Niveau zeigen, das ungefähr dem bei Abwesenheit von CO₂ entspricht. Das NT/BSA-Verhältnis wird in der erwähnten Literaturstelle nicht extra aufgeführt, lässt sich aber aus den abgebildeten Grafiken ungefähr bestimmen:

~ 2,2 (0 mM HCO₃⁻); ~ 4,7 (10 mM HCO₃⁻); ~ 4,5 (25 mM HCO₃⁻); ~ 4,2 (50 mM HCO₃⁻).

Die in Abschnitt 6.11.2 beschriebenen Versuche zeigen, dass der Grund für die Abweichung von den in der Literatur beschriebenen Daten nicht in den Reaktionsbedingungen oder den in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Stammlösungen zu suchen ist.

Die Daten der vorliegenden Arbeit geben keinen Aufschluss darüber, ob irgendwelche Tyrosinreste bevorzugt nitriert werden. An Humanserumalbumin (HSA), das BSA sehr ähnlich ist, konnten *Jiao et al. (2001)* den selektiven Charakter der Nitrierung zeigen. Obwohl sich unter entsprechend drastischen Bedingungen eine Vielzahl (oder alle) Tyrosinreste in HSA zu einem gewissen Grad nitrieren lassen, werden zwei Tyrosinreste, die in Bindungstaschen für hydrophobe Moleküle lokalisiert sind, bevorzugt durch PN nitriert. Als Grund hierfür vermuten die Autoren nicht-kovalente Wechselwirkungen der nitrierenden Spezies mit Teilen der Bindungstasche.

¹ bei pH 7,6 ist [HCO₃⁻]/[CO₂] ~ 30

In Abbildung 6.34 ist das Gel der BSA-Proben nach SDS-PAGE gezeigt. Die Proteinbanden wurden mit Silber gefärbt. In allen Spuren ist deutlich die BSA-Bande (Molmasse: 67 kDa) zu

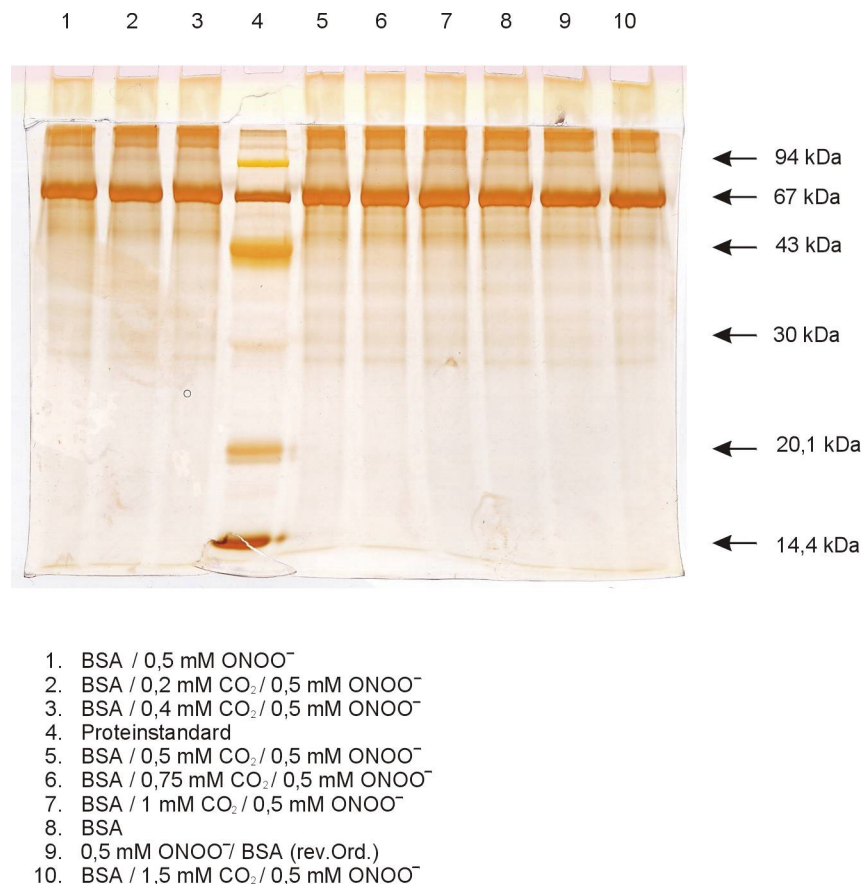


Abbildung 6.34: SDS-PAGE mit nachfolgender Silberfärbung von BSA, das mit 0,5 mM ONOO⁻ unter Variation der CO₂-Konzentration inkubiert wurde; die genauen Inkubationsbedingungen sind Abbildung 6.32 zu entnehmen. „BSA“ entspricht Protein, das nicht mit ONOO⁻ inkubiert wurde. „rev.Ord.“ bedeutet, dass BSA erst nach Isomerisierung von ONOO⁻ zu Nitrat dem Reaktionsansatz beigelegt wurde. Nach dem Gelpermeationsschritt wurden die Proben 1:1 mit *Probenpuffer* (siehe Abschnitt 5.4.2) für 30 min bei 37 °C inkubiert und auf das Gel (C = 12 %; T = 4 %) aufgetragen (mit Ausnahme von Spur 4 ca. 3 µg BSA / Spur). Nach Ende der Elektrophorese wurde eine Silberfärbung durchgeführt (siehe Abschnitt 5.4.3.2).

erkennen. Ebenso ist eine Bande am Übergang vom Sammel- zum Trenngel sichtbar, die eine höhere Molmasse als BSA besitzt und eine weitere bei ca. 45 kDa. Hierbei handelt es sich um BSA-Aggregate bzw. -Spaltprodukte oder Proteinverunreinigungen. Es ist jedoch klar erkennbar, dass die Ausbildung dieser Banden nicht aus der Inkubation mit ONOO⁻ resultieren (Vergleich Spur 8 mit den anderen Spuren). In dem Gel ist weder die Spaltung noch die Bildung von Oligomeren von BSA als Folge der Inkubation mit ONOO⁻ zu erkennen. Vielmehr sehen sich alle Spuren sehr ähnlich.

Abbildung 6.35 zeigt den Western Blot zur Detektion von NT. Die Betrachtung von BSA, das nicht mit ONOO^- inkubiert wurde (Spur 5), bestätigt die Spezifität des Antikörpers. Somit

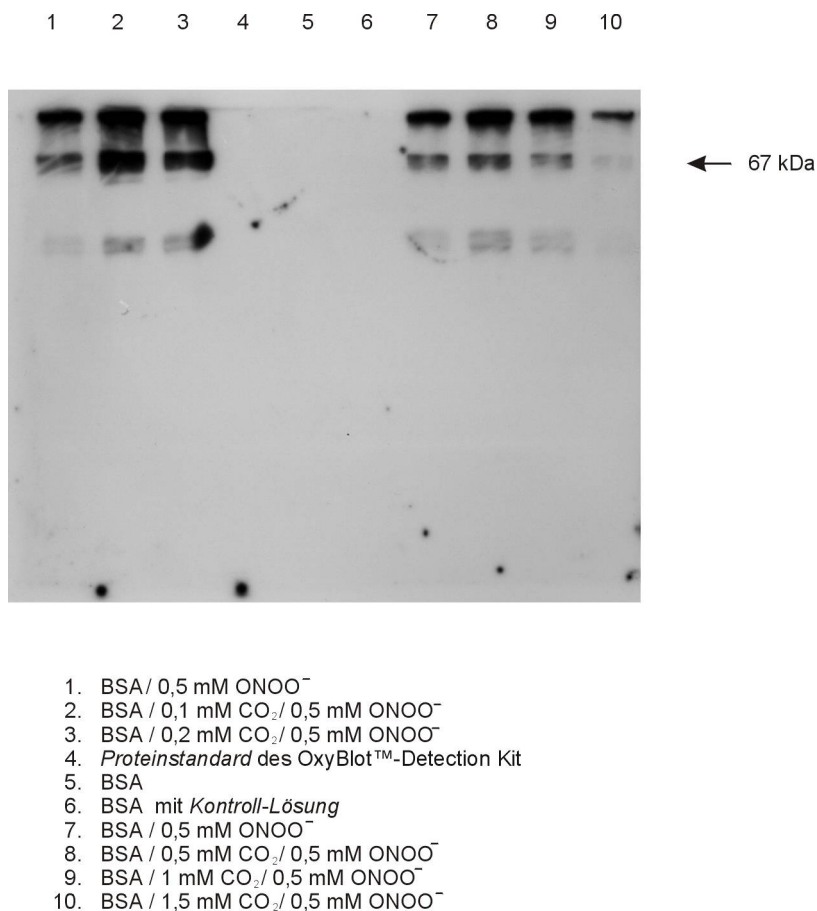


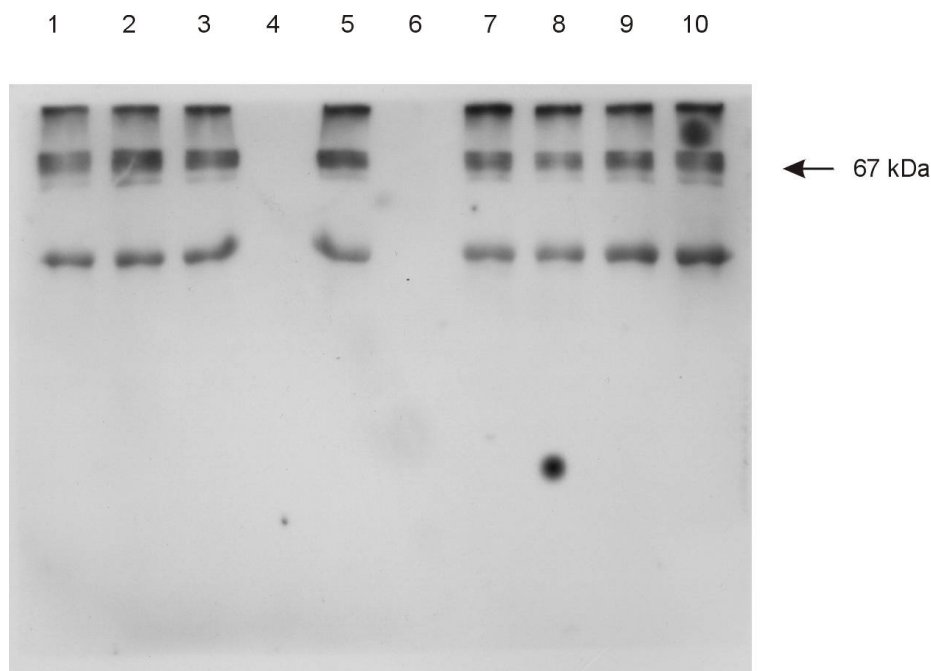
Abbildung 6.35: Western Blot zur Detektion von NT in BSA, das mit 0,5 mM ONOO^- unter Variation der CO_2 -Konzentration inkubiert wurde; „BSA“ wurde nicht mit ONOO^- inkubiert. Die genauen Inkubationsbedingungen sind Abbildung 6.32 zu entnehmen. Nach der Gelpermeation wurden die BSA-Proben mit SDS denaturiert und mit DNPH derivatisiert (siehe Abschnitt 5.4.10.4). Dieser Schritt wurde durchgeführt, da die Membran anschließend gestrippt (siehe Abschnitt 5.4.10.5) und ein Western Blot zur Detektion von Carbonylgruppen durchgeführt wurde. Hieraus erklärt sich auch die Belegung von Spur 4 und 6. In den Spuren (Ausnahme Spur 4) sind jeweils ~ 2,5 μg BSA aufgetragen. Das Ausbleiben von Signalen in Spur 5 zeigt, dass der Antikörper kein DNP erkennt (siehe Abbildung 6.36).

zeigt sich auch, dass das für die Versuche eingesetzte BSA vor Inkubation mit PN keine NT-Reste besitzt. In den anderen Spuren sind die drei Banden erkennbar, die bereits im Silbergel (siehe Abbildung 6.34) entdeckt wurden. Vor allem der Vergleich mit Abbildung 6.36 (Western Blot zur Detektion von Carbonylgruppen) zeigt, dass sich dieses Bandenmuster nicht durch den Einfluss von PN ausgebildet hat. In allen Spuren (Ausnahme Spur 4) wurde die gleiche Proteinmenge aufgegeben, so dass die Schwärzung proportional dem NT/BSA-

Gehalt ist. Der Vergleich der Schwärzungen bestätigt prinzipiell die Ergebnisse der NT/BSA-Werte, die aus den UV-VIS-Spektren erhalten wurden (siehe Abbildung 6.32). Dort wurde eine Zunahme der NT-Bildung (durch PN) in Anwesenheit geringer CO₂-Konzentrationen festgestellt mit einer maximalen Nitrierung bei ca. 0,2 mM CO₂. Weiteres Erhöhen der CO₂-Konzentration (≥ 1 mM) führte dann zu einem Absinken der NT-Bildung, die in etwa den Werten bei Abwesenheit von CO₂ entsprachen. Im Western Blot zur Detektion von NT ist das größte Signal in Spur 2 (0,1 mM CO₂) zu erkennen. Die Schwärzung in Spur 3 (0,2 mM CO₂) ist jedoch fast so intensiv wie die in Spur 2 und deutlich intensiver als die weiteren Signale. Das drittstärkste Signal zeigt Spur 8 (0,5 mM CO₂), was auch mit den Werten aus Abbildung 6.32 übereinstimmt. Das Signal in Spur 10 (1,5 mM CO₂) ist dagegen etwas schwächer als die Signale in Spur 1 und 7 (0 mM CO₂), obwohl die aus den UV-VIS-Spektren ermittelten NT/BSA-Werte ungefähr gleich groß sind. Die RP-HPLC mit UV-Detektion der aromatischen Aminosäuren (siehe Abbildung 6.33) zeigte dagegen analog dem Ergebnis des Western Blots höhere NT/BSA-Werte bei Abwesenheit von CO₂ (vgl. mit 1,3 mM CO₂) an.

Wenn man die drei Methoden (Bestimmung aus dem UV-VIS-Spektrum, RP-HPLC mit UV-Detektion, Western Blot zur Detektion von NT) zur Ermittlung des NT/BSA-Wertes bzw. seiner Änderung in Abhängigkeit von der CO₂-Konzentration abschließend betrachtet, kann man folgendes feststellen. Die Inkubation von BSA mit PN führt bei einer CO₂-Konzentration von 0,1-0,2 mM zu einer maximalen Nitrierung von Tyrosinresten. Ob der NT/BSA-Wert bei 1,3 mM CO₂ ungefähr genauso groß oder sogar tiefer als der Wert bei Abwesenheit von CO₂ ist, konnte nicht sicher geklärt werden. Die Bestimmung vertrauenswürdiger, absoluter Zahlenwerte für NT/BSA gelang nur aus den UV-VIS-Spektren.

In Abbildung 6.36 ist der Western Blot zur Detektion von Carbonylverbindungen gezeigt. Genauso wie im vorhergehenden Western Blot zur Detektion von NT (siehe Abbildung 6.35) erkennt man pro Spur drei Banden, von denen die 67 kDa-Bande eindeutig BSA zugeordnet werden kann. Die Spezifität des Antikörpers zur Detektion von DNP zeigt sich durch das



1. BSA / 0,5 mM ONOO⁻
2. BSA / 0,1 mM CO₂ / 0,5 mM ONOO⁻
3. BSA / 0,2 mM CO₂ / 0,5 mM ONOO⁻
4. *Proteinstandard* des OxyBlot™-Detection Kit
5. BSA
6. BSA mit *Kontroll-Lösung*
7. BSA / 0,5 mM ONOO⁻
8. BSA / 0,5 mM CO₂ / 0,5 mM ONOO⁻
9. BSA / 1 mM CO₂ / 0,5 mM ONOO⁻
10. BSA / 1,5 mM CO₂ / 0,5 mM ONOO⁻

Abbildung 6.36: Western Blot zur Detektion von Carbonylenresten (*OxyBlot*) in BSA, das mit 0,5 mM ONOO⁻ unter Variation der CO₂-Konzentration inkubiert wurde; „BSA“ wurde nicht mit ONOO⁻ inkubiert. Die genauen Inkubationsbedingungen sind Abbildung 6.32 zu entnehmen. Nach der Gelpermeation (siehe Abschnitt 5.3.8) mit *Aqua. bidest.* als Eluens wurden die BSA-Proben mit SDS denaturiert und mit DNPH derivatisiert. Carbonylfunktionen werden hierbei in stabile Hydrazone überführt (siehe Abschnitt 5.4.10.4). Nach der SDS-PAGE (siehe Abbildung 6.34) mit ~ 2,5 µg BSA/Spur (Ausnahme Spur 4) wurde der Western Blot durchgeführt (siehe Abschnitt 5.4.10). *Kontroll-Lösung* ist ein Bestandteil des OxyBlot™-Detection-Kit. Sie wird anstelle von DNPH-Lösung zum Protein gegeben. Wenn der Antikörper spezifisch DNP erkennt, darf in dieser Spur kein Signal sichtbar sein. Die Membran wurde zuvor einem Western Blot zur Detektion von NT unterzogen (siehe Abbildung 6.35) und anschließend durch „Strippen“ (siehe Abschnitt 5.4.10.5) für den *OxyBlot* vorbereitet.

Ausbleiben der Schwärzung in Spur 6, in der BSA nicht mit DNPH derivatisiert wurde. BSA, das nicht mit ONOO^- inkubiert wurde, besitzt bereits Carbonylreste, wie Spur 5 zeigt. An dieser Spur wird klar, dass das Auftreten von drei Banden pro Spur nicht die Folge des Einflusses von PN ist. Das Vorhandensein von Carbonylresten in Proteinen, die zuvor nicht zusätzlich oxidativ behandelt wurden, ist nicht außergewöhnlich. *Ischiropoulos et al. (1995)* stellten dies auch schon am Beispiel von BSA fest. Wenn diese das Protein mit PN (0,6 mM ONOO^- , pH 7,4) stressten, konnten sie jedoch eine Zunahme der Carbonylreste um den Faktor vier detektieren. Bei den eigenen Ergebnissen (0,5 mM ONOO^- , pH 7,4) konnte hingegen an BSA keine Zunahme der Carbonylreste durch PN nachgewiesen werden. Alle Proben inklusive der Referenz zeigen mehr oder weniger dasselbe Signal (In Spur 10 wurde durch eine Luftblase wahrscheinlich das Entfernen unspezifisch gebundenen Antikörpers in den Waschschritten verhindert. Dies führt zu einer artifiziell intensivierten Schwärzung). *Tien et al. (1999)* konnten am Beispiel von Glutamin-Synthetase zeigen, dass erst bei höheren pH-Werten ($> \text{pH } 8$) signifikant Carbonylgruppen durch PN in das Protein eingeführt werden (pH-Wert bei den eigenen Versuchen 7,4). Des Weiteren stellten diese am Beispiel von BSA fest, dass PN in Gegenwart von 1,3 mM CO_2 praktisch keine Bildung von Carbonylgruppen in BSA induziert. Eine Begründung für die vermehrte Bildung von Carbonylgruppen durch PN bei hohem pH-Wert in Abwesenheit von CO_2 könnte nach *Tien et al. (1999)* u.a. die längere Lebensdauer von PN unter diesen Bedingungen sein. Mit diesen Ergebnissen, die aber zum Teil an einem anderen Protein erhalten wurden, passen die eigenen Daten gut überein (siehe auch Abbildung 6.46).

Der *Proteinstandard* des OxyBlot™-Detection-Kit konnte nicht reproduzierbar durch Western Blot visualisiert werden. Hier ein Beispiel, in dem dies nicht gelungen ist. Daher wurde auch allgemein auf die Quantifizierung von Carbonylgruppen mittels des *Proteinstandards* (siehe Abschnitt 5.4.10.4) aus dem Western Blot verzichtet.

6.11.2 Reaktionen von Peroxynitrit mit Phenol in Gegenwart von Kohlendioxid

Um zu kontrollieren, ob in die Reaktionslösungen hohe Mengen an CO_2 (z.B. durch die ONOO^- -Stammlösung) eingebracht wurden oder andere Parameter unwissentlich in dieser Arbeit nicht berücksichtigt wurden, die das Abweichen der ermittelten Werte von den Literaturdaten erklären könnten (siehe Abschnitt 6.11.1), sind Versuche mit Phenol als Substrat anstelle von BSA durchgeführt worden. Dieses System ist mehrfach untersucht worden (*Lemercier et al., 1997; Uppu et al., 1996*) und die Zugänglichkeit der nitrierenden Spezies an das Substrat ist im Gegensatz zu Tyrosinresten in Proteinen, die möglicherweise

schlecht erreichbar im Innern des Proteins lokalisiert sind, gewährleistet. In Abbildung 6.37 sind die Ergebnisse dieser Untersuchung zusammengefasst. Als Index für die Nitrierung wurde die Zunahme der Absorption bei 405 nm (dieses Maximum wurde UV-VIS-spektroskopisch bestimmt) als Funktion der CO_2 -Konzentration aufgetragen. Zwischen 0-0,5 mM CO_2 kann man eine deutliche Zunahme der Bildung von Nitrierungsprodukten mit steigender CO_2 -Konzentration erkennen. Bei höheren CO_2 -Konzentrationen nimmt die Bildung von Nitrophenolen hingegen geringfügig ab.

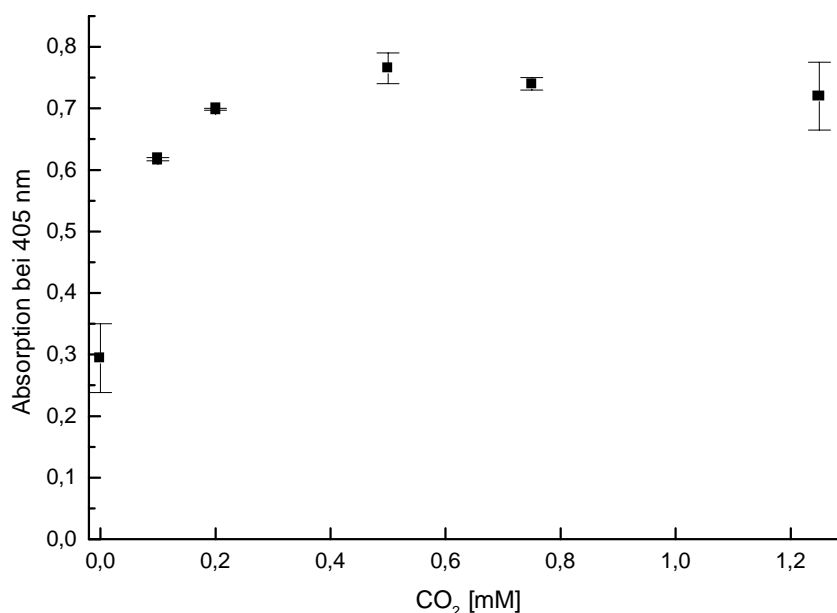


Abbildung 6.37: Zunahme der Absorption bei 405 nm durch Zugabe von 0,5 mM ONOO^- zu Phenol-Lösungen (1 mM) bei 37 °C in 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) unter Variation der CO_2 -Konzentration; der pH-Wert erhöhte sich durch die Zugabe von Peroxynitrit auf 7,5. Der pH-Wert der Lösungen wurde durch Zugabe von NaOH auf ca. 13,0 eingestellt, bevor die UV-VIS-Messung durchgeführt wurde.

Während im Bereich zwischen 0-0,5 mM CO_2 gute Übereinstimmung mit den Literaturdaten herrscht, ist in der Literatur ein weiteres Ansteigen der Nitrierungsreaktionen über diese CO_2 -Konzentration hinaus beschrieben (Aufgrund des hyperbolisches Verhaltens fällt diese Zunahme bei hohen CO_2 -Konzentrationen jedoch schon deutlich geringer aus).